

---

*Importància de la mida i tipus de  
fragment en la taxa de creixement  
d'Ulva ohnoi i estudi de la reactivació  
post període de manteniment en  
refrigerador*

---

Treball Final de Grau  
Enginyeria de Sistemes Biològics



UNIVERSITAT POLITÈCNICA  
DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

ESAB 2019

AUTOR: JOSEP BRINGUÉ GRAU  
TUTORS: INGRID MASALÓ LLORA  
JOAN OCA BARADAD

## RESUM

L'evident futur creixement de la població mundial exigeix la recerca de nous recursos naturals que puguin cobrir les necessitats nutricionals dels humans, i el consum d'algues podria ser una solució. L'alga és un recurs natural que pot ser manipulat pels humans i gràcies a aquesta manipulació pot ser induïda al creixement en massa per a l'obtenció de biomassa de l'alga que pot ser utilitzada per l'alimentació, animal i humana, així com per l'obtenció de productes utilitzats en farmàcia, cosmètica, etc.

En aquest projecte s'ha estudiat la possible relació existent entre la mida inicial d'*Ulva Ohnoi* i la seva taxa de creixement. A més a més, s'han estudiat les diferències de creixements entre fragments extrets de la part més propera a la zona d'ancoratge (zona basal) i fragments de la part més propera al perímetre de la fulla de l'alga (zona apical). Com a tercer apartat d'aquest projecte, s'ha realitzat l'estudi sobre la capacitat de reactivació d'*Ulva Ohnoi* post conservació a la nevera. Aquest procés podria ser introduït en el món del cultiu d'alga industrial per tal de planificar la producció d'acord amb la demanda.

En el primer experiment, on es comparava la taxa de creixement (SGR) de fragments amb diàmetre inicial diferent, s'han obtingut taxes de creixement de  $0.167d^{-1} \pm 0.067$  i  $0.167d^{-1} \pm 0.064$  en els fragments de diàmetre inferior i diàmetre superior respectivament, i  $0.192d^{-1} \pm 0.048$  en els de diàmetre intermedi. En el segon experiment en el qual es comparaven fragments apicals i basals les taxes de creixement mitjanes han estat de  $0.209d^{-1} \pm 0.084$  i de  $0.221d^{-1} \pm 0.065$  respectivament, però en els basals s'ha observat un retard en l'inici del creixement. Finalment, en el tercer i últim experiment, els fragments "reactivats" després d'un període d'una setmana a la nevera han presentat un SGR mig de  $0.236d^{-1} \pm 0.045$  tot i que hi ha hagut una pèrdua de biomassa els dies posteriors a l'etapa a la nevera. Els fragments amb major estança a la nevera no han sobreviscut.

**Paraules clau:** *Ulva ohnoi*, bioreactor, IMTA, SGR, superfície, mida fragment.

## RESUMEN

El evidente futuro crecimiento de la población mundial exige la búsqueda de nuevos recursos naturales que puedan cubrir las necesidades nutricionales de los humanos, y el consumo de algas puede ser una solución. El alga es un recurso natural que puede ser manipulado por el ser humano y gracias a esta manipulación puede ser inducida al crecimiento en masa para la obtención de biomasa del alga que puede ser utilizada para la alimentación, animal y humana, y también para la obtención de productos usados en farmacia, cosmética, etc.

En este proyecto se ha estudiado la posible relación existente entre el tamaño inicial de *Ulva Ohnoi* y su tasa de crecimiento. Además, se han estudiado las diferencias de crecimiento entre fragmentos extraídos de la parte cercana a la zona de anclaje (zona basal) i fragmentos de la parte más cercana al perímetro de la hoja del alga (zona apical). Finalmente, también se ha realizado el estudio de la capacidad de reactivación de *Ulva Ohnoi* post conservación en el refrigerador. Este proceso podría ser incorporado en el mundo del cultivo de alga industrial para planificar la producción conforme la demanda.

En el primer experimento, donde se comparaba la tasa de crecimiento (SGR) de los fragmentos con diferente diámetro inicial, se obtuvieron tasas de crecimiento de  $0.167d^{-1} \pm 0.067$  y  $0.167d^{-1} \pm 0.064$  en los fragmentos de diámetro inferior y diámetro superior respectivamente, y  $0.192d^{-1} \pm 0.048$  en los de diámetro intermedio. En el segundo experimento en el que se comparaban fragmentos apicales y basales las tasas de crecimiento medias han estado de  $0.209d^{-1} \pm 0.084$  y de  $0.221d^{-1} \pm 0.065$  respectivamente, pero en las basales se ha observado un retraso en el inicio del crecimiento. Finalmente, en el tercero y último experimento, los fragmentos “reactivados” después de un periodo de una semana en la nevera han presentado un SGR de  $0.236d^{-1} \pm 0.045$  a pesar de que ha habido una pérdida de biomasa en los días posteriores a la etapa en la nevera. Los fragmentos con mayor estancia en la nevera no han sobrevivido.

**Palabras clave:** *Ulva ohnoi*, bioreactor, IMTA, SGR, superficie, mida fragment.

## **ABSTRACT**

The obvious worldwide population future growth demands the research of new natural resources that can meet the human nutritional needs, and the algae consumption can be a solution. Algae is a natural resource that can be manipulated by humans and thanks to that manipulation it can be induced to growth in mass for the procurement of algae biomass, which can be used as animal or human alimentation, as well as to obtain pharmaceutical or cosmetic products, etc.

In this project, it has been studied the possible connection among the initial size of the *Ulva Ohnoi* and its growth rate. Moreover, it has been studied the growth differences between fragments extracted from the closest part of anchoring area (basal zone) and fragments from the closest part of the perimeter of the algae leaf (apical zone). Finally, it has been also studied the reactivation capacity of *Ulva Ohnoi* after a conservation period in a fridge. This is a process that could be easily incorporated into the world of algae industrial production in order to plan the production according to the demand.

In the first experiment, where the growth rate (SGR) of fragments with different initial diameter was compared, growth rates of  $0.167d^{-1} \pm 0.067$  and  $0.167d^{-1} \pm 0.064$  were obtained in lower and bigger diameter fragments respectively, and  $0.192d^{-1} \pm 0.048$  in those with intermediate diameter. In the second experiment in which apical and basal fragments were compared, average growth rates were  $0.209d^{-1} \pm 0.084$  and  $0.221d^{-1} \pm 0.065$  respectively, but at the basals, there was a delay in the onset of growth. Finally, in the third and last experiment, the “reactivated” fragments after a period of one week in the refrigerator presented an average growth rate of  $0.236d^{-1} \pm 0.045$  although there was a loss of biomass the days after refrigerator period. The fragments with larger stay in the refrigerator have not survived.

**Key words:** *Ulva ohnoi*, bioreactor, IMTA, SGR, surface, fragment size.

# SUMARI

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÍNDEX DE FIGURES .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ÍNDEX DE TAULES.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>AGRAÏMENTS.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1. INTRODUCCIÓ A LES ALGUES MARINES .....                                   | 9         |
| 1.1.1. Les macroalgues marines.....   | 9         |
| 1.1.2. Producció mundial .....  | 9         |
| 1.1.3. <i>Ulva Ohnoi</i> .....  | 10        |
| 1.2. ELS SISTEMES IMTA .....  | 13        |
| 1.3. OBJECTIUS .....  | 14        |
| <b>2. MATERIAL I MÈTODES.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1. SISTEMA IMTA UTILITZAT .....   | 15        |
| 2.2. BIOREACTORS UTILITZATS.....  | 17        |
| 2.3. EXPERIMENTS REALITZATS .....   | 17        |
| 2.3.1. Experiment 1: Fragments circulars de diferent diàmetre inicial .....   | 18        |
| 2.3.2. Experiment 2: Fragments zona basal i apical.....                       | 20        |
| 2.3.3. Experiment 3: Reactivació del creixement post fase de conservació..... | 22        |
| <b>3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1. EXPERIMENT 1: FRAGMENTS CIRCULARS DE DIFERENT DIÀMETRE ..                | 26        |
| 3.2. EXPERIMENT 2: FRAGMENTS ZONA BASAL I APICAL.....                         | 36        |
| 3.3. EXPERIMENT 3: REACTIVACIÓ DEL CREIXEMENT POST FASE DE CONSERVACIÓ.....   | 43        |
| <b>4. CONCLUSIONS .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>5. PERSPECTIVA PER FUTURS TREBALLS .....</b>                               | <b>51</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>   | <b>52</b> |

## ÍNDEX DE FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Comparació gràfica del % tones d'algues produïdes els anys 2006 i 2014 (Representació realitzada per Josep Bringué Grau, UPC, amb les dades de FAO, "Food and Agriculture Organization", 2018).....  | 10 |
| Figura 2: Comparació de les diferents morfologies d' <i>Ulva Ohnoi</i> en funció de la situació o no d'ancoratge. (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 17/04/2019). ....  | 11 |
| Figura 3: Representació esquematitzada d'un sistema IMTA comú (Carballo, 2012).....  | 13 |
| Figura 4: Organismes i tancs instal·lats en les instal·lacions de l'ESAB 1. Tanc de llenguados, 2. Filtre biològic, 3. Tancs d' <i>Ulva Ohnoi</i> (Fotografies dels tancs realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 17/04/2019). ....   | 15 |
| Figura 5: Representació gràfica de la distribució espacial del sistema IMTA utilitzat per al cultiu d'algues necessari per a aquest projecte. (Representació realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).....  | 16 |
| Figura 6: Perforador de suro o "cork borer" utilitzat per a la fragmentació en aquest experiment (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 17-04-2019). ....   | 18 |
| Figura 7: Fragments circulars acabats d'obtenir per a l'inici de l'experiment 1. Les tres fotos representen el mostreig inicial dels respectius diàmetres utilitzats. ....   | 19 |
| Figura 8: Radícula d'alga de paret (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 03-05-2019). ....   | 21 |
| Figura 9: Mostreig inicial dels fragments circulars basals i apicals. (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 03-05-2019). ....  | 21 |
| Figura 10: Mostreig inicial del conjunt abans d'introduir-lo a la nevera (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 16-04-2019). ....   | 23 |
| Figura 11: Bioreactors a l'inici de l'experiment (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC 04-04-2019).....   | 26 |
| Figura 12: Obstruccions en els bioreactors als 14 dies de l'inici de l'experiment (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC 17-04-2019). ....   | 26 |
| Figura 13: Mostreigs realitzats en el B1, diàmetre inicial= 0.8 cm als 0,4,7,11,14 i 19 dies d'iniciar l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019). ....  | 27 |
| Figura 14: Mostreigs realitzats en el B2, diàmetre inicial= 1 cm als 0,4,7,11,14 i 19 dies d'iniciar l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019). ....  | 27 |
| Figura 15: Mostreigs realitzats en el B3, diàmetre inicial= 1.2 cm als 0,4,7,11, 14 i 19 dies d'iniciar l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019). ....   | 27 |
| Figura 16: Evolució de l'SGR i la superfície total en cada bioreactor (cada bioreactor representa un diàmetre inicial determinat: 0.8, 1 i 1.2 cm).....  | 28 |
| Figura 17: Representació gràfica de la superfície de cada un dels 22 fragments en el 3r Mostreig. ....   | 30 |
| Figura 18: Representació gràfica de la superfície de cada un dels 22 fragments en el 5è Mostreig. ....   | 30 |
| Figura 19: Gràfica dels fragments que representaven el 75% de la biomassa total en cada bioreactor en l'últim mostreig. ....   | 31 |
| Figura 20: Histogrames de freqüència de les superfícies en els diferents temps (dies) de mostreigs (0,4,7,11,14, i 19). Tanc 1: Diàmetre inicial de 0.8 cm, Tanc 2: Diàmetre inicial de 1 cm, Tanc 3: Diàmetre inicial de 1.2 cm. La superfície es troba en mm <sup>2</sup> . .... | 32 |
| Figura 21: Fragments de creixement inusual. 1- B1, diàmetre inicial de 0.8 cm, 5è Mostreig. 2- B2, diàmetre inicial d'1 cm, 5è mostreig (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC).....   | 33 |
| Figura 22: Superfície i gruix dels 22 fragments del B1, de diàmetre inicial 0.8 cm, en el 5è i últim mostreig.....   | 33 |
| Figura 23: Superfície i gruix dels 22 fragments del B2, de diàmetre inicial 1 cm, en el 5è i últim mostreig.....   | 34 |
| Figura 24: Superfície i gruix dels 22 fragments del B3, de diàmetre inicial 1.2 cm, en el 5è i últim mostreig.....   | 34 |

|   |    |
|---|----|
| <i>Figura 25: Volum dels 22 fragments del B1, de diàmetre 0.8 cm, en el 5è mostreig.</i>  | 35 |
| <i>Figura 26: Volum dels 22 fragments del B2, de diàmetre 1 cm, en el 5è mostreig.</i>  | 35 |
| <i>Figura 27: Volum dels 22 fragments del B3, de diàmetre 1.2 cm, en el 5è mostreig.</i>  | 35 |
| <i>Figura 28: Mostreigs realitzats en el B2, fragments extrets de la zona basal de l'alga, zona propera a la radícula de la fulla als 0,4,7,11,14 i 17 dies des de l'inici de l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).</i> | 36 |
| <i>Figura 29: Mostreigs realitzats en el B3, fragments extrets de la zona apical de l'alga, zona propera al perímetre de la fulla als 0,4,7,11,14 i 17 dies des de l'inici de l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC,2019).</i>  | 36 |
| <i>Figura 30: Evolució dels SGR (considerant el 100% i 90% de la superfície) amb la respectiva evolució de la superfície. Els mostreigs s'han dut a terme els dies 0,4,7,11,14 i 17.</i>  | 38 |
| <i>Figura 31: Representació gràfica de la superfície dels 12 fragments basals i apicals en el 2on mostreig.</i>   | 39 |
| <i>Figura 32: : Representació gràfica de la superfície dels 12 fragments basals i apicals en el 4t mostreig.</i>  | 39 |
| <i>Figura 33: Representació gràfica de la superfície dels 12 fragments basals i apicals en el 5è i últim mostreig.</i>  | 39 |
| <i>Figura 34: Representació gràfica dels fragments que representen el 90% de la superfície de basals i apicals en el 4t mostreig.</i>   | 40 |
| <i>Figura 35: Representació gràfica dels fragments que representen el 90% de la superfície de basals i apicals en el 5è i últim mostreig.</i>   | 40 |
| <i>Figura 36: Histogrames de freqüència de les superfícies en els fragments basals i apicals en els diferents temps (dies) de mostreigs (0,4,7,11,14, i 17).</i>  | 41 |
| <i>Figura 37: Superfície i gruix dels 12 fragments del B2 i B3 (basals i apicals), de diàmetre inicial.</i>   | 41 |
| <i>Figura 38: Superfície i gruix dels 12 fragments del B2 i B3 (Basals i apicals) de diàmetre inicial 0.8 en el 3r mostreig.</i>  | 42 |
| <i>Figura 39: Superfície i gruix dels 12 fragments del B2 i B3 (basals i apicals), de diàmetre inicial 0.8 en el 3r mostreig.</i>   | 42 |
| <i>Figura 40: Mostreigs realitzats del paquet 0 de fragments de diàmetre inicial= 0.8 cm als 0,3,6,10,13,17 i 21 dies des de l'inici de l'etapa de creixement en bioreactors (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC. 2019).</i>               | 43 |
| <i>Figura 41: Evolució dels SGR amb la respectiva evolució de la superfície. Els mostreigs s'han dut a terme els dies 0, 10, 13, 16, 20, 23, 27 i 31.</i>   | 44 |
| <i>Figura 42: Superfície i gruix dels fragments del paquet 0, en el 7è Mostreig (31 dies des de l'inici de l'experiment).</i>   | 45 |
| <i>Figura 43: Histogrames de freqüència de les superfícies en els diferents temps (dies) de mostreigs (0, 10, 13, 16, 20, 23, 27 i 31).</i>   | 46 |
| <i>Figura 44: Fragments morts del paquet N5.</i>  | 46 |
| <i>Figura 45: Evolució de la temperatura ambient el dia en què es retiraven els fragments de la nevera (Font: <a href="http://www.freemeteo.es">www.freemeteo.es</a>).</i>  | 48 |

## ÍNDEX DE TAULES

|   |    |
|---|----|
| Taula 1: Condicions de cultiu de cada bioreactor amb llum (ON, mesurat entre 10-120 min després d'encendre els focus) i sense llum (OFF, mesurat 10 minuts abans d'encendre els focus) i un fotoperíode de 12L-12D. ....  | 19 |
| Taula 2: Condicions de cultiu de cada bioreactor amb llum (ON) i sense llum (OFF) i un fotoperíode de 12L-12D. ....   | 22 |
| Taula 3: Paràmetres en els quals es trobava el conjunt de fragments durant les tres etapes de l'experiment amb llum (ON) i sense llum (OFF) i un fotoperíode de 12L-12D durant l'etapa en el bioreactor. ....   | 24 |
| Taula 4: Procediment realitzat per a cada conjunt de mostres. ....  | 25 |
| Taula 5: Taula dels SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada un dels mostreigs i en cada un dels diferents diàmetres en els que s'ha treballat (0.8, 1 i 1.2 cm de Ø). ....   | 28 |
| Taula 6: Taula de mitjanes d'SGR obtingudes. ....   | 29 |
| Taula 7: Taula dels SGR (o taxa de creixement) obtinguts en fragments basals i apicals en cada un dels mostreigs. ....  | 37 |
| Taula 8: Taula dels SGR obtinguts en cada un dels mostreigs considerant només el 90% de la biomassa total dels fragments apicals i basals. ....   | 37 |
| Taula 9: Taula dels SGR obtinguts en cada un dels mostreigs realitzats en el Paquet 0. El mostreig inicial es va dur a terme abans d'introduir els fragments a la nevera. El 1r mostreig es va dur a terme al treure els fragments de la nevera. A partir del 1r mostreig, la resta són els mostreigs realitzats en l'etapa de cultiu als bioreactors. .... | 44 |
| Taula 10: Resum dels SGR mig obtinguts en els tres experiments realitzats en aquest TFG. ....   | 45 |
| Taula 11: Nombre de dies que van sobreviure cada conjunt de fragments amb les temperatures mínimes i màximes exteriors detectades en el dia en què es van treure els fragments de la nevera (Font: <a href="http://www.freemeteo.es">www.freemeteo.es</a> ). ....   | 47 |



## **AGRAÏMENTS**

A l'Íngrid Masaló Llorà, tutora d'aquest Treball de Fi de Grau, per la seva exigència, el constant suport, l'orientació i la confiança d'acompanyar-me durant la trajectòria del projecte.

A Joan Oca Baradad, cotutor del treball, per a l'ajuda igualment prestada i els consells donats per a la realització dels diferents experiments.

A tots aquells altres professors i professores que hi han col·laborat tot aportant el seu gra de sorra en el meu projecte, amb suggeriments i plantejament de qüestions que m'han inquietat, així com per exemple la Patricia Jiménez de Ridder per a la seva ajuda en tots els aspectes químics i anàlisis d'aigües. De la mateixa forma, agrair l'ajuda de Marta Ginovart Gisbert en l'anàlisi i interpretació estadística dels resultats. M'agradaria també afegir un agraïment a la Gloria Gorchs Coromines, professora de biologia de l'institut de Gironella, que m'ha ajudat a entendre i comprendre aspectes de l'àmbit de la biologia que han anat sorgint en aquest treball.

Als companys i companyes de la universitat pel seu interès i alleugeriment de la duresa que suposa realitzar aquests tipus de treballs; i a totes aquelles amistats extra universitàries que m'han acompanyat i han fet més amè el recorregut.

I com no, a la meva família, en especial a la meva mare Carme Grau Prat i el meu pare Josep Bringué Coll, ja que, cada un d'una forma o altra m'ha animat i ajudat a dur a terme aquest projecte de tan llarg i difícil camí.

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. INTRODUCCIÓ A LES ALGUES MARINES

Degut a què aquest projecte va destinat a l'estudi d'una espècie en concret de macroalga marina (l'*Ulva ohnoi*), es realitzarà només una breu descripció de les algues marines i posteriorment, una descripció una mica més detallada de l'espècie en qüestió.

### 1.1.1. Les macroalgues marines

Les algues marines, en general, són organismes autòtrofs en la seva totalitat, tot i que, com sempre, existeixen certes excepcions. Existeixen algunes espècies d'algues mixotròfiques que tenen la capacitat d'obtenir energia metabòlica a partir de la fotosíntesi així com també a través de composts orgànics o inorgànics (Quitral R., et al., 2012).

Les algues marines són organismes força simples, amb molt poca diferenciació cel·lular i tal·lòfites. Taxonòmicament es classifiquen en: *Chlorophyta*, *Phaeophyta* i *Rhodophyta*, que en termes simples es tradueix en algues verdes, brunes i vermelles, respectivament.

### 1.1.2. Producció mundial

A nivell industrial, més de la meitat de la producció d'algues marines va destinada al consum humà, en especial en les regions asiàtiques, la resta de producció estar més destinada a l'obtenció d'hidrocol·loides com l'agar, carragenina i alginats (Quitral R., et al. , 2012).

Segons la base de dades de la FAO (*Food and Agriculture Organization*, de les Nacions Unides), a la Xina es va produir aproximadament un 50% de volum total d'algues marines del món el 2014, on només el 2% provenien de la recollida, la resta provenia d'instal·lacions aquícoles. Indonèsia, Filipines i la República de Corea segueixen a la Xina en la classificació mundial de productors d'algues (Ferdouse et al., 2018)

Zanzíbar (Àfrica), el país amb més producció fora de les fronteres asiàtiques, va produir un 0.5% de les tones d'algues el 2014, una dada que destaca la gran potència mundial que representa Àsia en el mercat de les algues marines.

Altres països a destacar són: Xile (principal productor d'algues d'Amèrica del Sud amb el 0.05% de les tones mundials el 2014) (Ferdouse et al., 2018) i França (principal productor d'algues a Europa amb el 0.2% de les tones mundials el 2014).

Per tant, el mercat de les algues és un mercat àmpliament dominat pels països orientals tal com es mostra a la Figura 1.

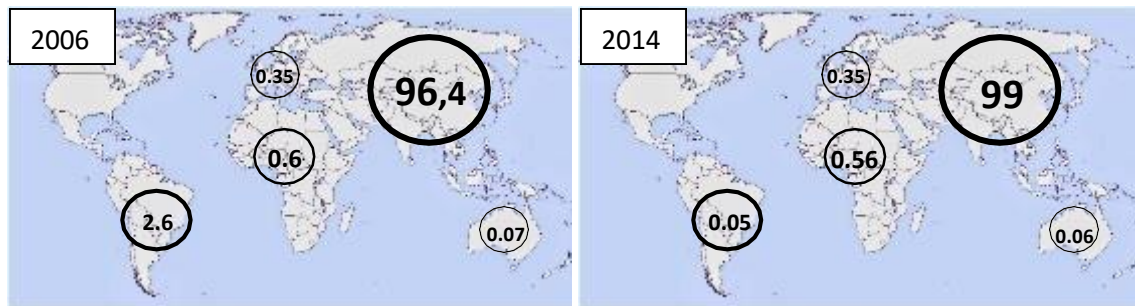


Figura 1: Comparació gràfica del % tones d'algues produïdes els anys 2006 i 2014 (Representació realitzada per Josep Bringué Grau, UPC, amb les dades de FAO, "Food and Agriculture Organization", 2018).

### 1.1.3. *Ulva Ohnoi*

*Ulva ohnoi* és una espècie d'alga verda marina endèmica de les costes del Japó (Hiraoka et al. 2004) però que recents estudis han confirmat que aquesta espècie es troba àmpliament estesa per moltes zones de la costa de la península Ibèrica (Coste, 2018). Taxonòmicament, es descriu com a: *Chlorophyta - Ulvophyceae - Ulvales - Ulvaceae - Ulvaceae - Ulva* (Fílum - Classe - Ordre - Família - Gènere) i espècie *U. Ohnoi*.

Aquesta alga verda es caracteritza per no disposar d'un tal·lus central però si que pot disposar d'un tal·lus d'ancoratge a partir del qual s'acaba formant un tal·lus flotant semi lliure (ja que el seu moviment està limitat per la zona d'ancoratge), tot i que en moltes ocasions, a la llarga, aquest tal·lus semi lliure flotant s'acaba desprenent de la zona d'ancoratge i adaptant el seu creixement en forma de tal·lus flotant lliure.

La làmina d'*Ulva ohnoi* sol ser gran però fràgil, ja que presenta un gruix d'entre 30-50 µm en la zona apical-mitja (Hiraoka et al., 2004) i un gruix d'entre 80-90µm en la zona basal (Curra Feijoó, 2017). Aquesta fragilitat ve donada per la seva composició microscòpica, ja que, la gran majoria d'espècies del gènere *Ulva sp.*, presenten dues capes cel·lulars mantingudes per una paret cel·lular de

polisacàrids (Coste, 2018). Aquesta espècie, regularment alterna la gametogènesi dioica amb l'espogènesis, i es reproduïx a partir del tal·lus flotant lliure o semi lliure mitjançant reproducció vegetativa per fragmentació (Hiraoka et al., 2004). L'*Ulva Ohnoi*, com es va veure en un TFG realitzat anteriorment, té la capacitat d'ancorar-se a través de la radícula, així com per exemple, en parets de metacrilat, cordes d'espart o cordes de polièster (Escribano, 2019) (Figura 2).



- Es troben flotant lliurement. Presentaran una radícula molt poc diferenciada de la resta de la fulla. Creixement horitzontal per aprofitar al màxim la llum que arriba a la superfície de l'aigua.



- Es troben aferrades a les parets de polietilè d'alta densitat dels tancs. Presenten una zona basal quasi immòbil i una zona apical flotant semi lliure. Creixement en vertical per anar a la recerca de la llum i també per evitar l'ombra de la resta d'algues de la paret.



- Es troben agafades a les cordes de polièster. Adopten una forma molt rugosa, formant com un sac. Igual que les anteriors, presenten una radícula força diferenciada de la resta de la fulla.

*Figura 2: Comparació de les diferents morfologies d'Ulva Ohnoi en funció de la situació o no d'ancoratge. (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 17/04/2019).*

### 1.1.3.1. Paràmetres que afecten al creixement d' *Ulva ohnoi*

La llum és el principal factor abiòtic que més influeix en el cultiu de macroalgues, i per consegüent, en el cultiu d'*Ulva ohnoi*, ja que és una espècie fotosintetitzadora i per tant necessita la llum com a font d'energia per a dur a terme la fotosíntesi oxigènica i el metabolisme anabòlic (Casais E., 2016).

A part de l'energia lumínica, la fotosíntesi oxigènica necessita una aportació determinada de carboni en forma de  $\text{CO}_2$ . En el Cicle de Calvin de la fotosíntesi oxigènica s'usa el  $\text{CO}_2$  com a substrat, a partir de la metabolització del qual (i també de l'aigua) es generarà oxigen i hidrats de carboni (composts orgànics). Cal destacar que el carboni representa el 50% de la biomassa en pes mesurat en base seca lliure de cendres (Casais E., 2016). Alguns estudis però han demostrat que el gènere *Ulva sp.* és capaç de, en situacions de baixa concentració de carboni orgànic, utilitzar  $\text{HCO}_3^-$  (Bicarbonat) directament a través de la membrana plasmàtica (Axelsson et al., 1999).

Un altre component important en la composició de les algues és el nitrogen. Aquest representa el 5% de la biomassa en pes sec, es troba formant part de les proteïnes i dels nucleòtids. Tant el  $\text{N-NO}_3^-$  com el  $\text{N-NH}_4^+$  són dues formes assimilables per les algues (tot i que tenen preferència pel  $\text{N-NH}_4^+$ ).

El tercer component, però no menys important, és el fòsfor. Es troba tant en molècules estructurals (fosfolípids) com en importants intermediaris metabòlics

La temperatura és un altre factor imprescindible a tenir en compte pel cultiu d'aquesta espècie. Com s'ha esmentat anteriorment, l'*Ulva Ohnoi* és una espècie procedent de les costes del Japó, és per això, que el creixement òptim es dona a temperatures entre 20-25 °C (Hiraoka et al., 2004), és més, per sota dels 10 °C el creixement és nul o quasi nul (Notoya, 1999, citat per (Hiraoka et al., 2004)).

Altres paràmetres que poden influir en la taxa de creixement de l'*Ulva Ohnoi* són el cicle de vida en què es trobi l'alga, que com s'ha esmentat anteriorment, té un cicle de vida força complex, en el qual existeix una alternança entre fase de gametòfits i fase d'espòròfits, la morfologia, que en general, ve determinada pel règim hidrodinàmic que s'adopta, l'estat fisiològic de l'alga, les variacions de nutrients, en especial, la relació N:P, el pH (Rang pH òptim: 8-10), l'alcalinitat i la salinitat (Casais E., 2016).

## 1.2. ELS SISTEMES IMTA

Un sistema IMTA (*Integrated Multi-Trophic Aquaculture*) és un sistema utilitzat en aquicultura per tal d'aprofitar al màxim qualsevol producte generat pels organismes que conformin el sistema. És un sistema format per diverses línies tròfiques (Tal com es mostra en la Figura 3), és a dir, per diversos nivells tròfics altament relacionats i dependents entre ells.

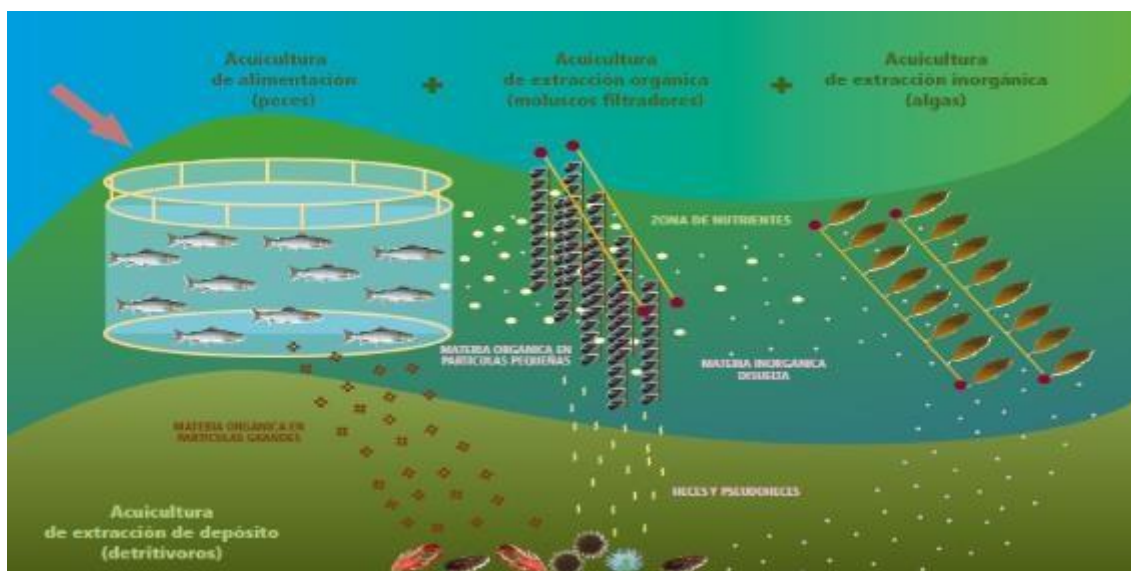


Figura 3: Representació esquematitzada d'un sistema IMTA comú (Carballo, 2012).

Són sistemes que permeten una producció aquícola equilibrada i un augment de la qualitat de l'aigua que hi circula. La presència de les macroalgues en aquests sistemes garanteixen efectes de biomitigació i redueixen l'eutrofització de l'aigua (Carballo, 2012).

Els nivells tròfics més comunament usats en aquest tipus de sistemes són: peixos – filtradors (com per exemple bivalves) – Algues – Alimentadors del fons.

Cada nivell tròfic, com si fos un ecosistema, té la seva funció (DFO, 1996):

- **Peixos:** Generen residus orgànics i inorgànics com a resultat de la seva activitat metabòlica però també com a resultat d'aliments no ingerits. Aquests residus seran una aportació de composts inorgànics, sobretot, de nitrogen amoniacal, fosfats i carboni.
- **Filtradors:** Es troben en el pas intermedi entre peixos i algues. Són els encarregats de filtrar la columna d'aigua i de reduir les partícules orgàniques a partícules molt més fines.

- **Algues:** Tenen la capacitat d'extreure els nutrients inorgànics dissolts en la columna d'aigua com per exemple el nitrogen i el fòsfor. D'aquesta forma, redueixen les concentracions de composts inorgànics generats per la resta de nivells tròfics.

Existeix també un quart nivell tròfic anomenat “els alimentadors de dipòsit o del fons”. Aquest quart nivell tròfic està format bàsicament per invertebrats força primitius (com eriçons de mar, alguns tipus de cucs marins, etc.) que filtren tots aquells sediments produïts per la resta de nivells per tal d'alimentar-se de partícules orgàniques (DFO, 1996).

### 1.3. OBJECTIUS

Aquest projecte pretén centrar-se sobretot en l'estudi de la taxa de creixement de l'alga *Ulva ohnoi* per tal d'optimitzar-ne el cultiu a escala industrial. S'estudia el creixement a partir de tres situacions:

- Creixement en funció del diàmetre inicial dels fragments.
- Creixement en funció de la zona de l'alga de la qual provenen els fragments (zona apical o basal).
- Reactivació del creixement després de la seva interrupció mitjançant la conservació en un refrigerador durant un període de temps.

## 2. MATERIAL I MÈTODES

### 2.1. SISTEMA IMTA UTILITZAT

Aquest sistema està actualment instal·lat en el laboratori de les instal·lacions de l'ESAB (Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, UPC Castelldefels) on es cultiven algues i llenguados (Figura 4).

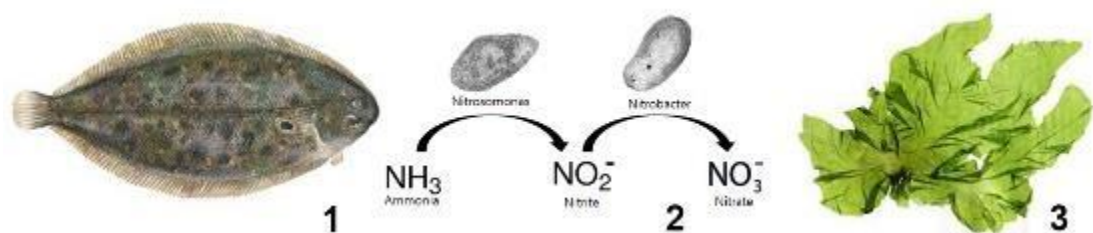


Figura 4: Organismes i tancs instal·lats en les instal·lacions de l'ESAB 1. Tanc de llenguados, 2. Filtre biològic, 3. Tancs d'*Ulva Ohnoi* (Fotografies dels tancs realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 17/04/2019).

Els llenguados es troben en un tanc cilíndric d'1 m de diàmetre i l'aigua que en surt passa al tanc d'expansió on hi ha el filtre biològic.

Pel que fa a les algues, aquestes es troben distribuïdes en 5 tancs. Dos d'aquests tancs tenen una superfície rectangular però amb una secció de fons semicircular de  $0.64 \text{ m}^2$  (172 L). Els 3 tancs restants són tancs cilíndrics de  $0.32 \text{ m}^2$  (90 L).



La distribució dels diferents tancs està representat a la Figura 5.

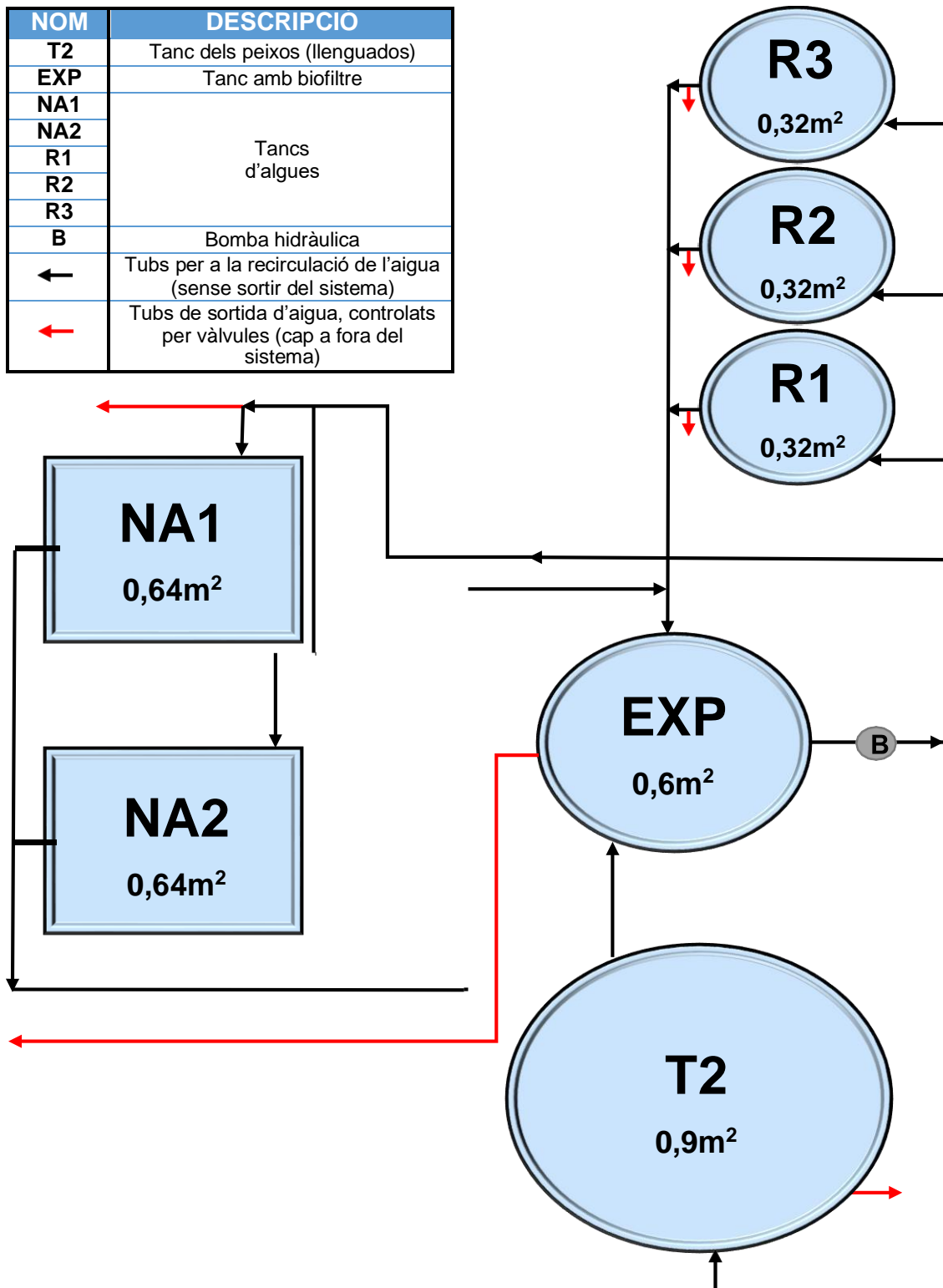


Figura 5: Representació gràfica de la distribució espacial del sistema IMTA utilitzat per al cultiu d'algues necessari per a aquest projecte. (Representació realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).

Totes les algues utilitzades en els experiments realitzats en aquest projecte han estat extretes dels diferents tancs del sistema IMTA (en funció de l'experiment) representats en la Figura 5.

## 2.2. BIOREACTORS UTILITZATS

S'han utilitzat 3 bioreactors iguals (B1, B2 i B3), construïts manualment l'any passat per a la realització d'un Treball de Fi de Grau (Escribano, 2019), però a causa del seu estat i també a certs problemes que van ser reflectits en el mateix TFG van ser desmuntats parcialment (les parts més malmeses) i reconstruïts.

Els dos principals problemes que es van presentar en aquests bioreactors eren:

- La presència de bandes i vores, que al ser tallades i manipulades a mà, quedaven molt poc definides/llises i es produïen rugositats en el material. Aquestes rugositats aportaven superfícies no desitjades en les quals la biomassa es podia aferrar, produint obstruccions i evitant el correcte moviment de la biomassa dins del bioreactor.
- El sistema d'agitació per aire situat a la base del bioreactor no era del tot igual en els tres. Tant el B1 com el B3 generaven una agitació mitjançant bombolla fina, mentre que el B2 generava una agitació per bombolla gruixuda.

En la resta d'aspectes, els tres bioreactors eren iguals entre ells. Aquests eren sistemes tancats amb un determinat volum d'aigua. El dimensionat d'aquests es troba descrit al detall en l'Annex A.

## 2.3. EXPERIMENTS REALITZATS

Tal com s'ha esmentat en l'apartat d'objectius, s'ha dividit el treball en tres experiments diferents:

1. Experiment 1: Fragments circulars de diferent diàmetre.
2. Experiment 2: Fragments zona basal i apical.
3. Experiment 3: Reactivació del creixement post fase de conservació.

Tot i ser tres experiments diferents, tots giren al voltant de l'estudi de la taxa de creixement; en el primer cas, la taxa de creixement s'estudia en funció de la superfície inicial, en el segon, en funció de la zona; i finalment en l'últim experiment s'estudia la possibilitat de reactivació del creixement després de mantenir les algues a baixes temperatures.

Per a la mesura del creixement s'estudiava la superfície dels fragments. El programa utilitzat per a la mesura de superfície és l'ImageJ, el protocol d'ús del qual es troba descrit en l'Annex D. A part, també s'estudiava l'evolució del gruix, aquest es va mesurar amb un micròmetre.

### 2.3.1. Experiment 1: Fragments circulars de diferent diàmetre inicial

#### Obtenció dels fragments

Una morfologia inicial exacte entre fragments (en aquest cas, circular) permet una homogeneïtat quasi del 100% entre les mostres inicials. La falta d'homogeneïtat només venia de les diferències en la procedència dels fragments.

Per tal de contrarestar aquestes diferències, totes les algues usades per a obtenir els fragments van ser extretes del mateix tanc, del R3, per tant, havien crescut totes en les mateixes condicions abans de ser fragmentades.

Es van escollir algues que no presentaven zona basal, ja que d'aquestes se'n podia obtenir més fragments a partir de cada fulla (augmentant l'homogeneïtat entre ells).

Per a l'obtenció dels fragments es va utilitzar un perforador de suro (Figura 6). Aquesta eina permet realitzar de forma manual fragments circulars de diferents diàmetres, en el cas del de la Figura 6 des de 0.8 cm fins a 1.62cm.

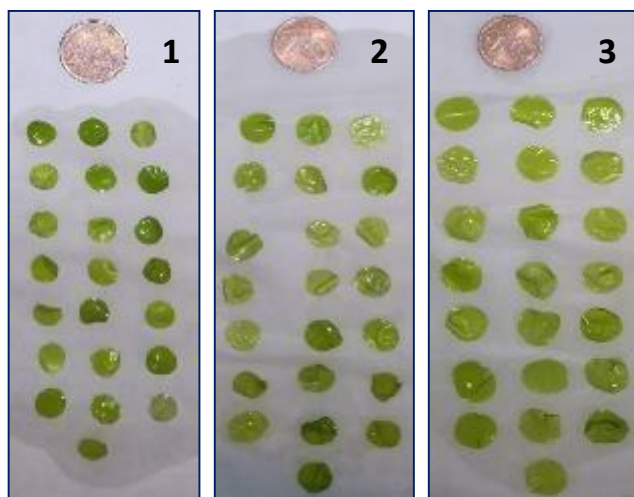
D'aquesta forma es pot assegurar una molt bona homogeneïtat en la morfologia entre els diferents fragments inicials.



*Figura 6: Perforador de suro o "cork borer" utilitzat per a la fragmentació en aquest experiment (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 17-04-2019).*

En aquest cas, es van utilitzar fragments de tres diàmetres diferents: 0.8, 1 i 1.2 cm de diàmetre (Figura 7). Els fragments de diàmetre inicial 0.8, 1 i 1.2 es van introduir en els bioreactors B1, B2 i B3 respectivament.

*Importància de la mida i tipus de fragment en la taxa de creixement d'Ulva ohnoi i estudi de la reactivació post període de manteniment en refrigerador.*



*Figura 7: Fragments circulars acabats d'obtenir per a l'inici de l'experiment 1. Les tres fotos representen el mostreig inicial dels respectius diàmetres utilitzats.*

### Condicions de cultiu

Les condicions de cultiu dels tres bioreactors es detallen a la Taula 1.

*Taula 1: Condicions de cultiu de cada bioreactor amb llum (ON, mesurat entre 10-120 min després d'encendre els focus) i sense llum (OFF, mesurat 10 minuts abans d'encendre els focus) i un fotoperíode de 12L-12D.*

| <b>Paràmetre</b>               | <b>B1</b> |            | <b>B2</b> |            | <b>B3</b> |            | <b>Unitats</b>                         |
|--------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|--|
| <b>Il·luminació</b>            | <b>ON</b> | <b>OFF</b> | <b>ON</b> | <b>OFF</b> | <b>ON</b> | <b>OFF</b> |  |
| <i>Temperatura</i>             | 17.81     | 17.73      | 18.08     | 17.77      | 17.76     | 17.63      | °C                                     |
| <i>pH</i>                      | 8.52      | 8.48       | 8.60      | 8.46       | 9.56      | 9.40       | -                                      |
| <i>Saturació O<sub>2</sub></i> | 100.38    | 100        | 101.38    | 99.33      | 100.50    | 100        | %                                      |
| <i>[O<sub>2</sub>]</i>         | 9.58      | 9.43       | 9.59      | 9.47       | 9.56      | 9.40       | $\frac{mg\ O_2}{L}$                    |
| <i>Il·luminació</i>            | 60-80     | -          | 60-80     | -          | 60-80     | -          | $\frac{\mu mols\ fotons}{m^2 \cdot s}$ |

Els bioreactors es van omplir amb 3L d'aigua procedent de la part superior del tanc que conté el biofiltre esmentat en l'apartat 3.1, i així assegurar que estava lliure de partícules grolleres. Tot i ser un sistema tancat, ja que no hi ha cabals d'entrada ni de sortida, l'aigua s'anava renovant cada 3-4 dies, coincidint amb els mostreigs.

La mesura de la temperatura, així com també del pH, saturació d'oxigen i concentració d'aquest es va fer amb sondes (Handy pH i Handy Polaris de la marca OxyGuard).

També es va dur a terme un control de l'alcalinitat, ja que aquesta defineix la disponibilitat de carboni en l'aigua, un aspecte que pot limitar el creixement de l'alga. A diferència de la resta de paràmetres, la mesura de l'alcalinitat no ha requerit l'ús de sondes (El protocol/mètode utilitzat per al càlcul d'aquest paràmetre es troba definit a l'Annex B). L'alcalinitat es va mantenir entre 115 i  $122 \frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}}$  durant l'experiment.

Els mostreigs es van realitzar cada 3-4 dies, a raó de dues vegades per setmana, coincidint en dilluns i dijous. En total es van realitzar 6 mostreigs per bioreactor, es feien fotos, s'analitzava la superfície amb l'ImageJ i es calculava el SGR o taxa de creixement entre mostreigs:

$$SGR = \frac{\ln\left(\frac{P_f}{P_i}\right)}{Temps}$$

En comptes de treballar en termes de massa, es treballava en termes de superfície. D'aquesta forma, les unitats del SGR eren  $\text{d}^{-1}$ . L'experiment va durar 19 dies.

### 2.3.2. Experiment 2: Fragments zona basal i apical.

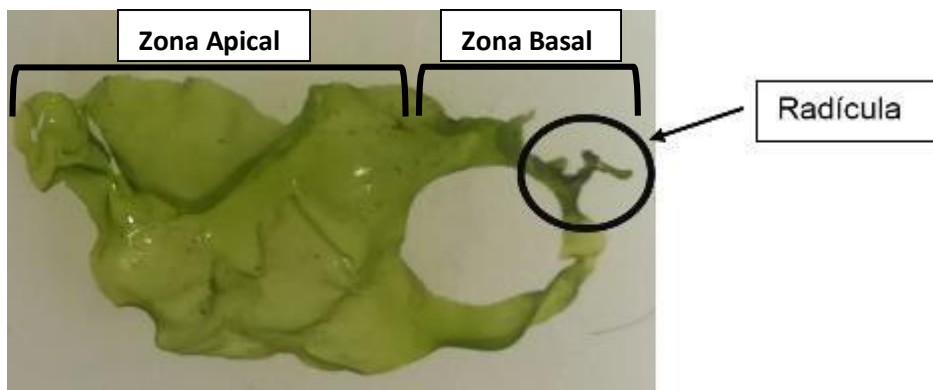
#### Obtenció dels fragments

De la mateixa forma que amb l'experiment 1, en aquest segon experiment també es va treballar amb fragments circulars per tal d'obtenir la màxima homogeneïtat inicial. La fragmentació es va realitzar de la mateixa forma que l'experiment anterior.

En aquest cas les mostres s'han extret d'algues de paret dels tancs NA1 i NA2 (Figura 5). La forma més precisa de fer-ho hauria estat extreure les algues del mateix tanc per assegurar que havien crescut en les mateixes condicions abans de l'experiment, però això no va ser possible a causa de la poca quantitat que presentaven els dos tancs per separat d'alga de paret suficientment gran per a l'extracció de fragments.

Degut a la pobra població d'algues de paret i també a la possibilitat de necessitar-ne més en el futur, es va treballar amb menys mostres inicials que el primer experiment. En aquest cas, es va treballar amb 12 mostres de cada i amb un diàmetre comú de 0.8 cm. El sistema inicial estava basat en dos bioreactors:

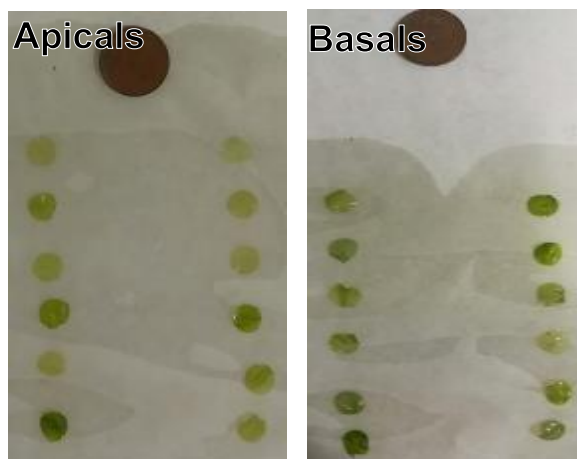
- B2: Bioreactor en el qual es trobaven els fragments propers a la radícula, és a dir, zona basal. Diàmetre inicial de 0.8 cm, 12 fragments en total.
- B3: Bioreactor en el qual es trobaven els fragments propers al perímetre, és a dir, zona apical. Diàmetre inicial de 0.8 cm, 12 fragments en total.



*Figura 8: Radícula d'alga de paret (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 03-05-2019).*

Com es pot veure a la Figura 8, de cada alga només es va poder extreure un fragment proper a la radícula.

Finalment, els fragments obtinguts sobre els quals es basarà aquest experiment són els següents:



*Figura 9: Mostreig inicial dels fragments circulars basals i apicals. (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 03-05-2019).*

Els fragments apicals (propers al perímetre) es van introduir en el B3, mentre que els fragments basals (propers a la radícula) es van introduir en el B2.

#### Condicions de cultiu

Els dos bioreactors, com en l'experiment 1, es trobaven quasi sota les mateixes condicions, les quals es recullen a la següent taula:

*Taula 2: Condicions de cultiu de cada bioreactor amb llum (ON) i sense llum (OFF) i un fotoperíode de 12L-12D.*

| <b>Paràmetre</b>               | <b>B2</b> |            | <b>B3</b> |            | <b>Unitats</b>                         |
|--------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|--|
| <b>Il·luminació</b>            | <b>ON</b> | <b>OFF</b> | <b>ON</b> | <b>OFF</b> |  |
| <i>Temperatura</i>             | 19.20     | 18.74      | 19.20     | 18.57      | °C                                     |
| <i>pH</i>                      | 8.58      | 8.53       | 8.59      | 8.59       | -                                      |
| <i>Saturació O<sub>2</sub></i> | 100       | 99.57      | 99.60     | 100        | %                                      |
| <i>[O<sub>2</sub>]</i>         | 9.22      | 9.31       | 9.20      | 9.41       | $\frac{mg\ O_2}{L}$                    |
| <i>Il·luminació</i>            | 50-70     | -          | 50-70     | -          | $\frac{\mu mols\ fotons}{m^2 \cdot s}$ |

Les mesures es van realitzar amb les mateixes sondes que l'experiment anterior.

L'alcalinitat es va mantenir al voltant de  $150\ m\ \frac{g\ CaCO_3}{L}$ .

Cada un dels dos bioreactors es va omplir amb 3 L d'aigua que s'anava renovant cada 3-4 dies (coincidint amb els mostreigs). En total es van realitzar 6 mostreigs per bioreactor, es feien fotos i s'analitzava la superfície amb l'ImageJ. L'experiment va durar 17 dies.

### 2.3.3. Experiment 3: Reactivació del creixement post fase de conservació.

En aquest tercer experiment s'ha estudiat la forma de poder "reactivar" fragments un cop hagin passat un temps a la nevera. Per a fer-ho s'han dut a terme una sèrie de sub-experiments, cada un conformat per un conjunt de mostres. Sobre cada conjunt de mostres es variaven les condicions per tal d'estudiar-ne el comportament. Les fases/ etapes que s'han dut a terme són: Obtenció dels fragments – (Pre-Nevera) - Nevera – Adaptació – Creixement en bioreactors.

S'explicarà el procés complet realitzat per al paquet 0, ja que la resta de paquets, tot i trobar-se en condicions diferents, la base del procediment és la mateixa. L'etapa pre-nevera només s'ha dut a terme en determinats paquets de fragments.

### **Paquet 0**

Aquest paquet de fragments es va mantenir a la nevera durant 8 dies (del 16/04/2019 fins al 23/04/2019), van passar un dia “d’adaptació” (del 24/04/2019 fins al 25/04/2019), i posteriorment, un període de 22 dies en el qual es van dur a terme els mostreigs.

Obtenció dels fragments: En aquest 3r experiment també interessava començar amb condicions de màxima homogeneïtat, per això, l’obtenció dels fragments es va realitzar de la mateixa forma que els experiments 1 i 2, amb la mateixa eina de fragmentació circular.

En aquest cas, es van obtenir 10 fragments de 0.8 cm de diàmetre a partir d’algues del tanc R3.

Nevera: El mostreig inicial correspon al mostreig realitzat abans d’introduir els fragments a la nevera. Aquest mostreig inicial és el de la Figura 10.

Aquests fragments es van mantenir a la nevera durant 8 dies a una temperatura d’entre 7-8 °C.



*Figura 10: Mostreig inicial del conjunt abans d’introduir-lo a la nevera (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 16-04-2019).*

Adaptació: Un cop es van treure de la nevera no es van traslladar al bioreactor sinó que, amb el mateix pot en el qual es trobaven a la nevera, es va deixar el paquet 0 al laboratori, sense llum (sense focus directes, una possible mínima il·luminació provinent de l’exterior) i sense agitació. D’aquesta forma, es va intentar adaptar els fragments a les condicions ambientals, ja que com es pot observar en la Taula 3, es trobaven a una temperatura de 7.6 °C i a les fosques (mentre estaven a la nevera).

L’endemà, l’aigua on es trobaven els fragments ja estava, més o menys, a la temperatura ambient del laboratori ( $\approx T^a$  exterior del laboratori).

Creixement en els bioreactors: Un cop finalitzada aquesta fase d’adaptació, el paquet 0 es va introduir en el bioreactor 1 (B1), amb aeració i llum (12L:12D) i una alcalinitat mitjana de  $185.23 \frac{mg \text{ CaCO}_3}{L}$ .



Es van realitzar mostrejos cada 3-4 dies, i de la mateixa forma que amb els experiments 1 i 2, es renovava l'aigua del bioreactor al mateix dia en què es duia a terme el mostreig, es feien fotos i s'analitzava la superfície amb l'ImageJ. L'experiment va durar 31 dies.

La taula següent mostra els paràmetres en què es trobava aquest conjunt de fragments en les diferents etapes esmentades anteriorment.

*Taula 3: Paràmetres en els quals es trobava el conjunt de fragments durant les tres etapes de l'experiment amb llum (ON) i sense llum (OFF) i un fotoperíode de 12L-12D durant l'etapa en el bioreactor.*

| <b>Paràmetre</b>   | <b>Nevera</b> | <b>Adaptació</b> | <b>Bioreactor</b> |       |
|--|---------------|------------------|-------------------|-------|
| <i>Il·luminació</i>  | OFF           | OFF              | ON                | OFF   |
| <i>Temperatura (°C)</i>  | 7.6           | 19               | 19.12             | 18.80 |
| <i>pH</i>  | 7.94          | 7.98             | 8.57              | 8.48  |
| <i>Saturació O<sub>2</sub> (%)</i>   | 98            | 90               | 100.29            | 97.44 |
| <i>[O<sub>2</sub>] (mg/L)</i>  | 11.6          | 8.3              | 9.27              | 9.08  |
| <i>Il·luminació<br/>(<math>\mu\text{mols fotons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}</math>)</i> | 0             | <10              | 50-60             | 0     |

### **Altres paquets de fragments**

Per tal d'estudiar el procés de conservació en nevera, s'han realitzat més conjunts de fragments per tal d'intentar millorar el procés de reactivació i estudiar el comportament de les mostres quan, per exemple, s'incrementa el temps a la nevera, o també, quan s'implementa una fase de creixement en bioreactors abans de la fase de conservació a la nevera (Taula 4).

La il·luminació utilitzada en els cultius era de 50-70  $\mu\text{mols fotons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mentre que la il·luminació durant l'etapa d'adaptació era inferior als 10  $\mu\text{mols fotons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Taula 4: Procediment realitzat per a cada conjunt de mostres.

| Obtenció dels fragments |                     |                   | Cultiu pre-nevera <sup>1</sup> | Nevera        |              | Adaptació     | Cultiu post-nevera           |
|-------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------|---------------|--------------|---------------|------------------------------|
| Nom                     | Origen <sup>2</sup> | Mida inicial (cm) | Durada (Dies)                  | Durada (Dies) | Il·luminació | Durada (Dies) | Bombolla <sup>3</sup>        |
| 0                       | R3                  | 0.8               | -                              | 8             | NO           | 1             | Petita                       |
| 1                       | R3                  | 0.8               | -                              | 27            | NO           | 1             | Petita                       |
| 2                       | R3                  | 0.8               | -                              | 33            | NO           | 1             | Petita                       |
| 3                       | B2 <sup>4</sup>     | 1                 | -                              | 8             | NO           | 4             | No va entrar als bioreactors |
| 4                       | B2                  | 1                 | -                              | 27            | NO           | 1             | Petita                       |
| J1                      | R3                  | 1                 | 7                              | 28            | NO           | 1             | Petita                       |
| J2                      | R3                  | 1                 | 7                              | 35            | 6-10         | 1             | Petita                       |
| N5                      | R3                  | 1                 | -                              | 28            | NO           | 1             | Petita                       |
| N6                      | R3                  | 1                 | -                              | 30            | NO           | 1             | Petita                       |

<sup>1</sup> En els paquets 0,1,2,3,4, N5 i N6 no s'ha realitzat cultiu en bioreactors abans de la nevera.

<sup>2</sup> Origen: Tanc (Figura 5) del qual s'han extret les mostres.

<sup>3</sup> Mida de la bombolla utilitzada per l'agitació.

<sup>4</sup> B2 és el bioreactor de l'experiment 1.

### 3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

#### 3.1. EXPERIMENT 1: FRAGMENTS CIRCULARS DE DIFERENT DIÀMETRE

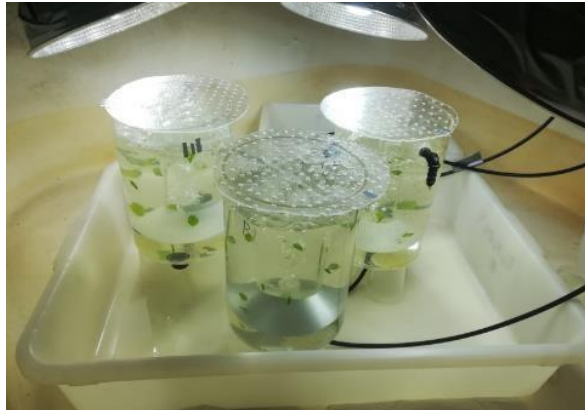
El sistema inicial era el fotografiat en la figura 11.

Problemes observats: Tot i haver estat millorats, els bioreactors, a l'estar fets manualment, contenen certes imperfeccions que, com es pot observar en la Figura 12, van produir obstruccions puntuals, les quals van influir en el correcte moviment dels fragments i la normal recepció de la llum. Cal destacar, però, que aquestes obstruccions no es van produir fins al 3r-4t mostreig, quan els fragments ja presentaven una certa grandària.

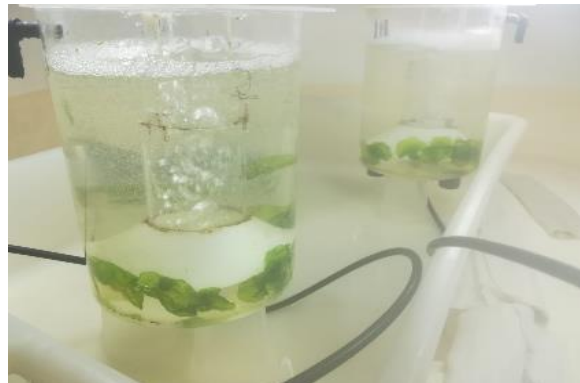
Com es podrà observar en les fotografies dels diferents mostreigs en les Figures 13, 14 i 15, aquestes

obstruccions podrien haver influït, tant en la morfologia final dels fragments (ja que alguns fragments, al final de l'experiment, es troben més arrugats que altres) com també en la taxa de creixement, ja que algunes algues han presentat una aturada del creixement que pot ser deguda a haver-se quedat entre diferents algues en aquestes obstruccions impossibilitant la recepció de la llum. Per a solucionar-ho, es van retirar les tapes a partir del 3r Mostreig.

Aquestes tapes/embuts són imprescindibles en els primers dies, ja que ajudaven a la circulació dels fragments inicials, però una vegada aquests ja agafen una certa mida, ja no necessiten aquesta "ajuda" per a circular.



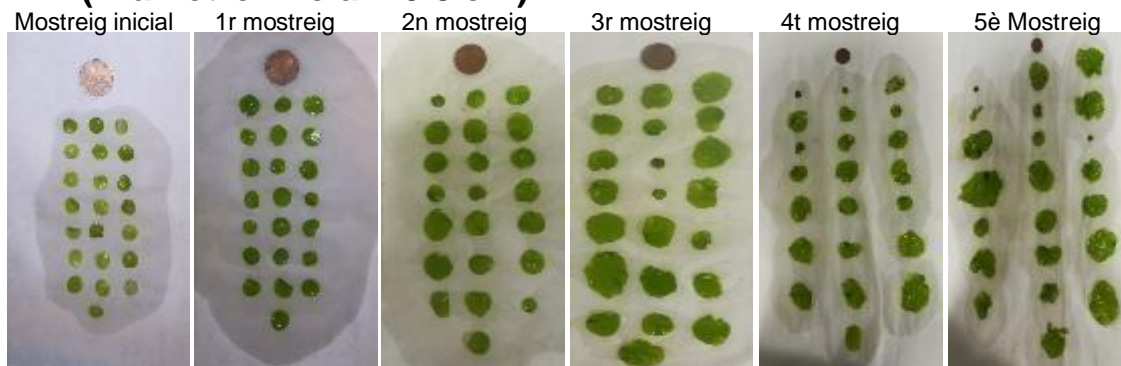
*Figura 11: Bioreactors a l'inici de l'experiment (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC 04-04-2019).*



*Figura 12: Obstruccions en els bioreactors als 14 dies de l'inici de l'experiment (Fotografia realitzada per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC 17-04-2019).*

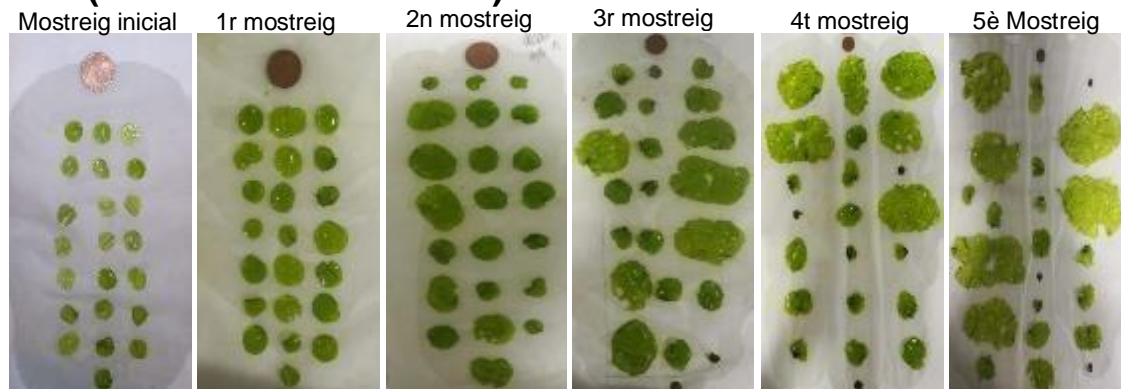
Els diferents mostreigs es troben representats a continuació en funció del bioreactor al qual pertanyen.

### **B1 (Diàmetre inicial= 0.8 cm)**



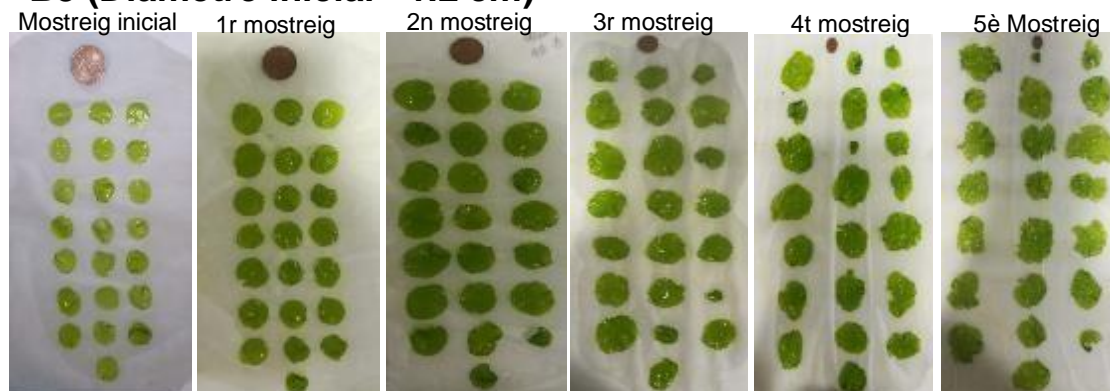
*Figura 13: Mostreigs realitzats en el B1, diàmetre inicial= 0.8 cm als 0, 4, 7, 11, 14 i 19 dies d'iniciar l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).*

### **B2 (Diàmetre inicial= 1 cm)**



*Figura 14: Mostreigs realitzats en el B2, diàmetre inicial= 1 cm als 0, 4, 7, 11, 14 i 19 dies d'iniciar l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).*

### **B3 (Diàmetre inicial= 1.2 cm)**



*Figura 15: Mostreigs realitzats en el B3, diàmetre inicial= 1.2 cm als 0, 4, 7, 11, 14 i 19 dies d'iniciar l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).*

En l'Annex C es troben detallades les taules de resultats de superfícies, gruixos i volums.

## SGR (Specific growth rate)

El SGR obtingut en aquest experiment s'ha recollit en la següent taula:

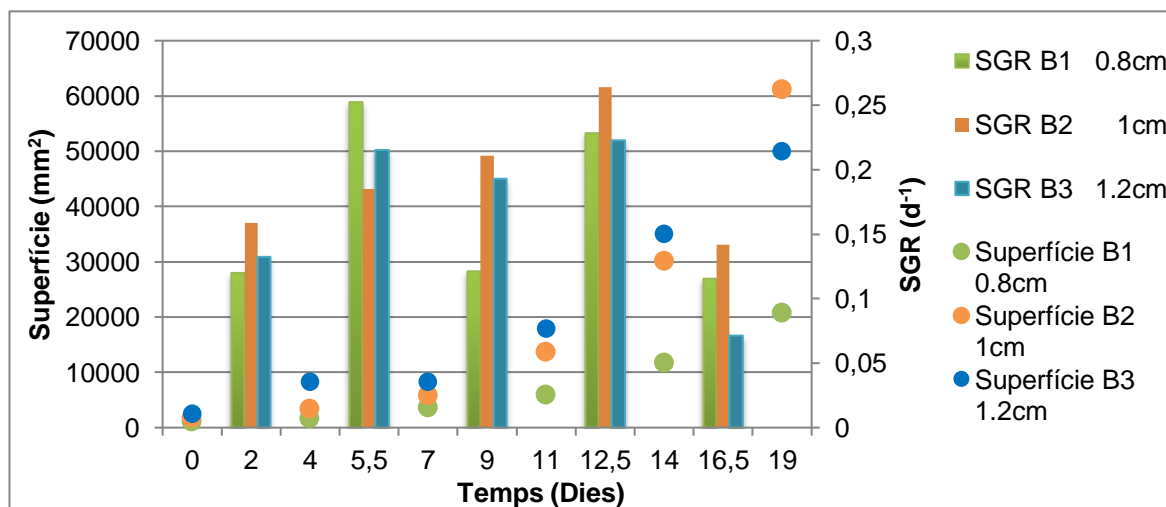
*Taula 5: Taula dels SGR (o taxa de creixement) obtinguts en cada un dels mostreigs i en cada un dels diferents diàmetres en els que s'ha treballat (0.8, 1 i 1.2 cm de Ø).*

|               | SGR ( $d^{-1}$ )             |                         |                         |                          |                          |                          |
|---------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | Mostreig inicial<br>(0 dies) | 1r Mostreig<br>(4 dies) | 2n Mostreig<br>(7 dies) | 3r Mostreig<br>(11 dies) | 4t Mostreig<br>(14 dies) | 5è Mostreig<br>(19 dies) |
| <b>B1 0.8</b> | 0                            | 0.120                   | 0.252                   | 0.121                    | 0.228                    | 0.115                    |
| <b>B2 1</b>   | 0                            | 0.159                   | 0.185                   | 0.211                    | 0.264                    | 0.142                    |
| <b>B3 1.2</b> | 0                            | 0.132                   | 0.215                   | 0.193                    | 0.223                    | 0.071                    |

Com es pot observar el Bioreactor 2 va obtenir el pic màxim, amb un  $0.264d^{-1}$  de SGR en el 4t Mostreig, seguit del Bioreactor 1 amb un  $0.252d^{-1}$  en el 2n Mostreig i el Bioreactor 3 amb un  $0.223d^{-1}$  en el 4t Mostreig.

En el Treball de Fi de Grau realitzat en aquestes mateixes instal·lacions, es van obtenir taxes de creixement una mica superiors a les obtingudes aquí, per exemple, es va treballar amb fragments de 0.5 cm de diàmetre inicial i es van obtenir pics de  $0.37 d^{-1}$  i  $0.35 d^{-1}$  (amb una excepció de  $0.67 d^{-1}$ ) entre el 4t i el 7è dia (Escribano, 2019).

Altres autors, com per exemple, Coutinho i Zingmark (1993), van obtenir en el cultiu de *U. Curvata* valors de  $0.21 d^{-1}$  (Coutinho i Zingmark, 1993), Neori i Gordin (1991) i Geertz-Hansen (1993) treballant amb *U. lactuca L.* van obtenir pics de  $0.18 d^{-1}$  i  $0.199 d^{-1}$ , respectivament (Neori i Gordin, 1991; Geertz-Hansen et al., 1993).



*Figura 16: Evolució de l'SGR i la superfície total en cada bioreactor (cada bioreactor representa un diàmetre inicial determinat: 0.8, 1 i 1.2 cm).*

El més destacat és el SGR del B2, on el diàmetre inicial dels fragments era d'1 cm. Els valors del B2 van anar en augment fins a quasi l'últim mostreig tal com es pot observar a la figura 16. En termes generals es podria dir que els diàmetres superiors (1 i 1.2 cm) van presentar taxes de creixement superiors i més constants.

Sabent que les mitjanes dels SGR de cada bioreactor han estat les de la Taula 6, no es podria confirmar si el diàmetre inicial influeix en la reproducció vegetativa (creixement), ja que diàmetres diferents han obtingut SGR iguals.

*Taula 6: Taula de mitjanes d'SGR obtingudes.*

| Bioreactor | SGR ( $d^{-1}$ )  |
|------------|-------------------|
| 1          | 0.167 $\pm$ 0.067 |
| 2          | 0.192 $\pm$ 0.048 |
| 3          | 0.167 $\pm$ 0.064 |

Per tal d'estudiar les mitjanes obtingudes, s'ha realitzat una ANOVA entre les tres situacions (diàmetres diferents) i s'ha obtingut un valor de  $F=0.290$ , inferior al valor crític per a  $F(3.885)$  fet que no permet rebutjar la hipòtesi nul·la (Igualtat de mitjanes) i que, en resum, amb els valors obtinguts no es podria parlar de diferències significatives.

El que sí que es pot observar és que el B2 presenta un SGR diferent de la resta. Partint de la base que, com s'ha esmentat en l'apartat 3.2 el B1 i B3 difereixen de B2 en el tipus d'agitació (B1 i B3 s'agiten per bombolla fina i B2 per bombolla gruixuda), podria ser aquesta la raó de la diferència de SGR mig. Alguns autors però esmenten que un sistema de bombolles excessivament grans podria causar problemes (Goldman et al., 1981; Alvarez Cobelas i Gallardo García, 1989; Gaitero, 2012;) però en aquest cas, el bombolleig major ha obtingut el SGR superior.

Pel que fa al descens final dels SGR en tots els bioreactors és degut a les necessitats de volum, és a dir, els fragments han adquirit ja una mida excessivament gran pel volum del bioreactor. Això fa que s'accentuï l'auto ombreig entre fragments produint una disminució del SGR.



## Superfície

Es pot estudiar l'evolució de la superfície individualment tal com es mostra en les figures següents:

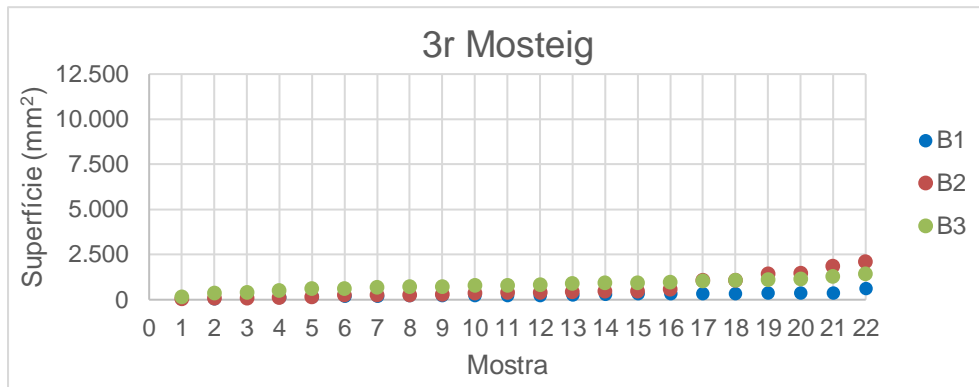


Figura 17: Representació gràfica de la superfície de cada un dels 22 fragments en el 3r Mostreig.

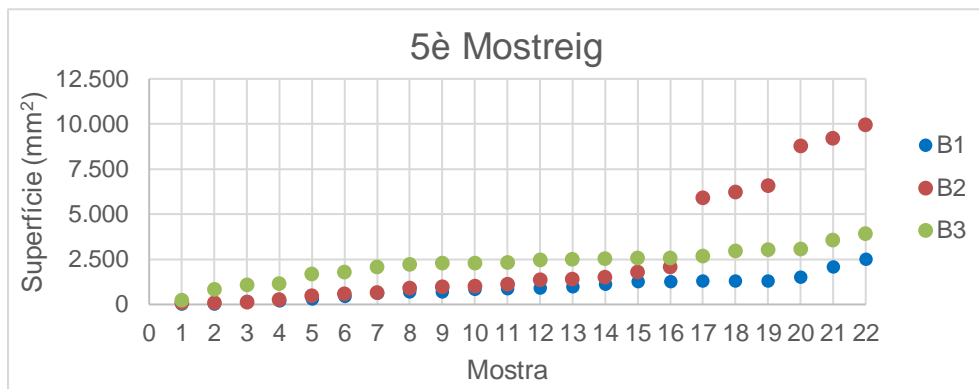


Figura 18: Representació gràfica de la superfície de cada un dels 22 fragments en el 5è Mostreig.

En les anteriors figures s'observa el 3r mostreig, ja que és el punt en el qual es comencen a denotar les diferències entre bioreactors i el 5è i últim mostreig, on es mostra els resultats finals de l'experiment.

Encara que destaquen fragments del B2 es pot observar com la gran majoria dels fragments del B3 han mantingut una superfície superior als fragments del B2 i B1 en tots els mostreigs. Tot i això, és de destacar l'evolució dels sis fragments més grans de cada bioreactor, ja que com podem veure, els sis fragments de major superfície del B2 han superat els del B3 de forma significativa.

Per tal de ressaltar el creixement d'aquests sis fragments del B2 es pot treballar amb el 75% de la biomassa. La figura 19 mostra quins fragments en el 5è Mostreig representen el 75% de la biomassa total en cada bioreactor:

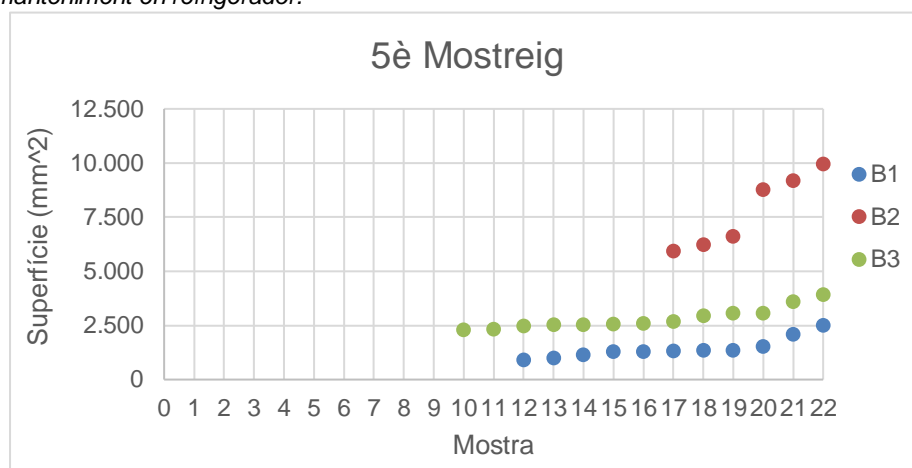


Figura 19: Gràfica dels fragments que representaven el 75% de la biomassa total en cada bioreactor en l'últim mostreig.

La diferència entre B2 i els altres dos bioreactors pel que fa a les superfícies més grans es fa més notòria quan s'observa que el 75% de la biomassa del B2 es troba només en un 27% dels fragments, mentre que en el B1 es troba en el 50% i en el B3 en quasi el 60% dels fragments. Per altra banda, la raó per la qual B3 és el que presenta un major nombre de mostres necessàries per a arribar al 75% de la biomassa és degut a que hi ha gran part dels fragments del B3 que han augmentat de forma simultània/uniforme.

Degut a que no es podia realitzar bé el seguiment individual, també s'ha estudiat el global, és a dir l'evolució de la superfície global en cada mostreig. La forma que s'ha establert per tal d'estudiar aquesta superfície global ha sigut mitjançant histogrames de distribució. Aquests, es troben representats en la Figura 20.

En la Figura 20, el més destacable és el B3, ja que com es pot observar, les superfícies a partir del 3r Mostreig (11 dies), van anar adoptant una distribució normal / gaussiana.

Aquesta distribució indica uniformitat, és a dir, com s'ha dit anteriorment, el B3 presenta una major quantitat de fragments que han augmentat la seva superfície de forma semblant (el pic de la distribució), a diferència del B1, on quasi no hi ha uniformitat, ja que existeixen fragments de quasi totes les mides, i en el B2 on sí que hi ha un pic de fragments de poca superfície però també existeix una sèrie de fragments que han despuntat.



## DISTRIBUCIÓ EXPERIMENT 1

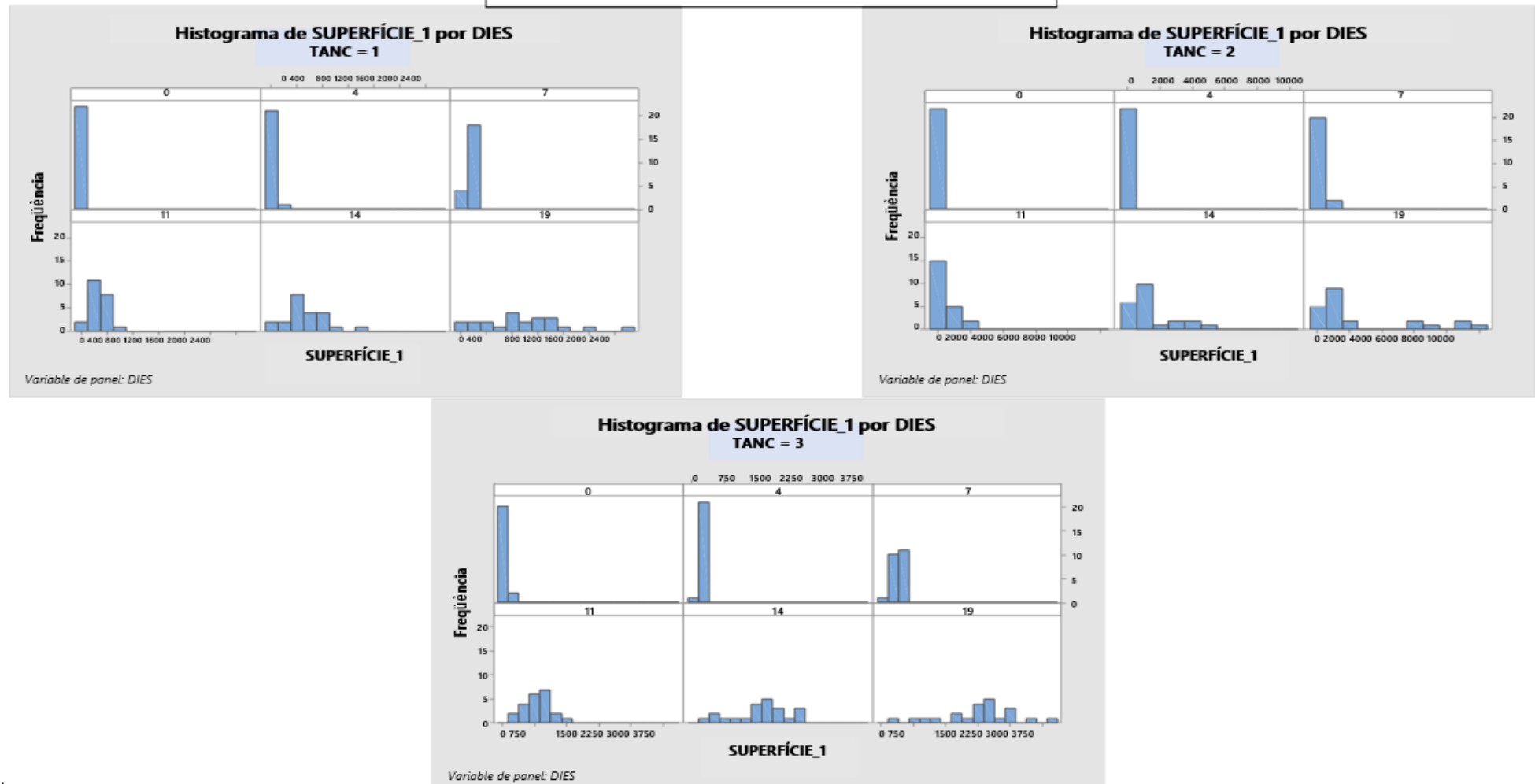


Figura 20: Histogrames de freqüència de les superfícies en els diferents temps (dies) de mostreigs (0,4,7,11,14, i 19). Tanc 1: Diàmetre inicial de 0.8 cm, Tanc 2: Diàmetre inicial de 1 cm, Tanc 3: Diàmetre inicial de 1.2 cm. La superfície es troba en mm².

### Volum de biomassa per mostra i relació superfície-gruix

Com s'ha esmentat anteriorment, i com es pot veure en la següent figura existeixen certs fragments en els quals s'ha vist aturat el seu creixement (fins i tot alguns presenten una reducció de la superfície).

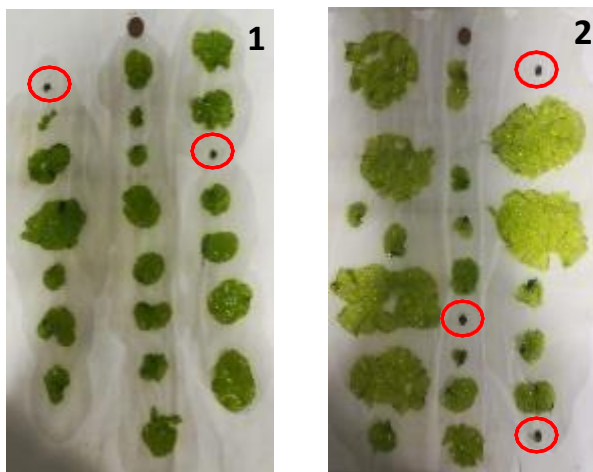


Figura 21: Fragments de creixement inusual. 1- B1, diàmetre inicial de 0.8 cm, 5è Mostreig. 2- B2, diàmetre inicial d'1 cm, 5è mostreig (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC).

En les dues imatges anteriors es veuen fins a 5 fragments que, passats els 19 dies (5è Mostreig), van finalitzar l'experiment amb un diàmetre quasi semblant a l'inicial, si més no, no van superar el diàmetre de la moneda de 2 cèntims (Diàmetre moneda 2 cèntims: 18.75 mm). Una raó, com també s'ha esmentat anteriorment, podria haver estat produïda per les obstruccions puntuals o per la grandària de la bombolla del sistema d'agitació.

Tot i això, la representació de la superfície enfront del gruix (figures 22, 23 i 24), pot donar una possible explicació a com ha sigut l'evolució d'aquests fragments.

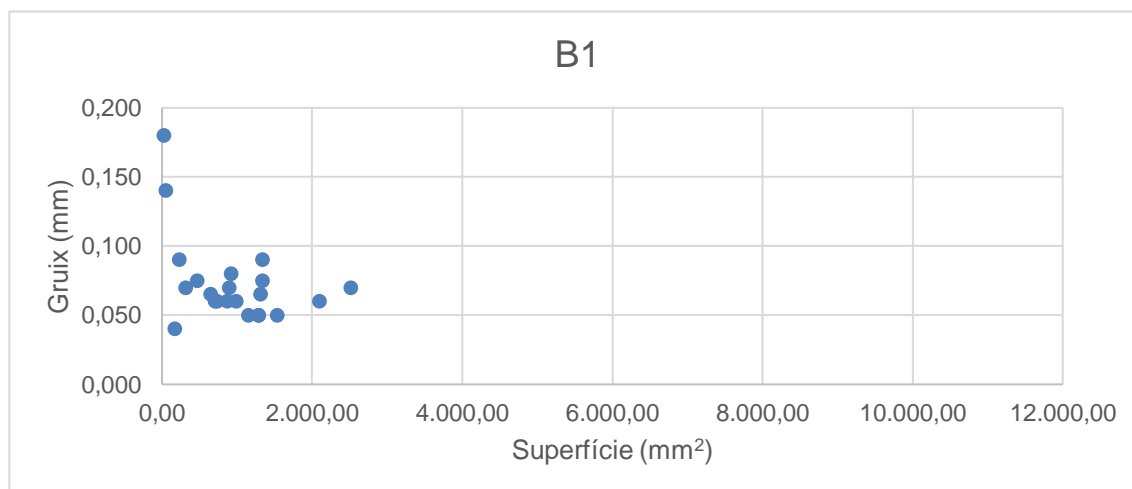


Figura 22: Superfície i gruix dels 22 fragments del B1, de diàmetre inicial 0.8 cm, en el 5è i últim mostreig.

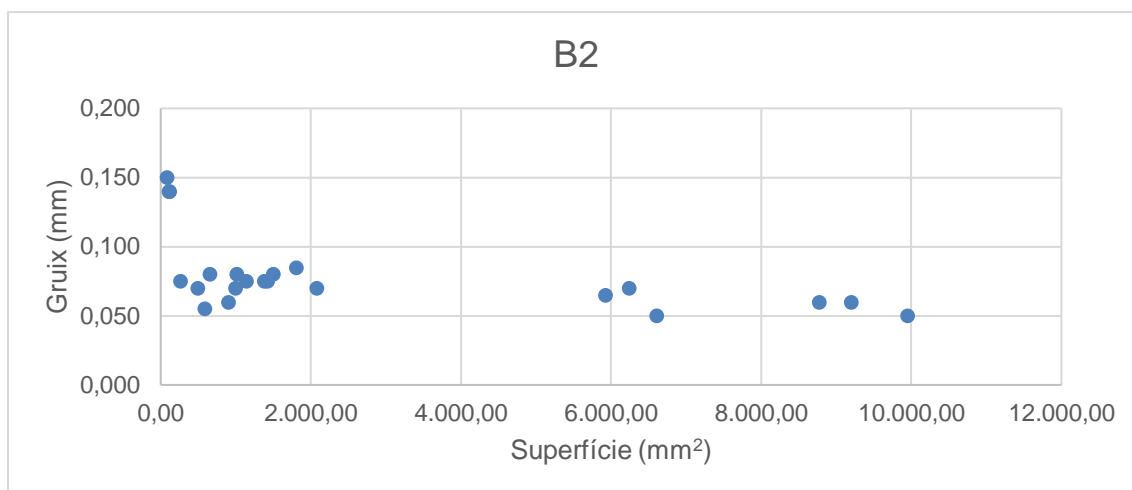


Figura 23: Superfície i gruix dels 22 fragments del B2, de diàmetre inicial 1 cm, en el 5è i últim mostreig.

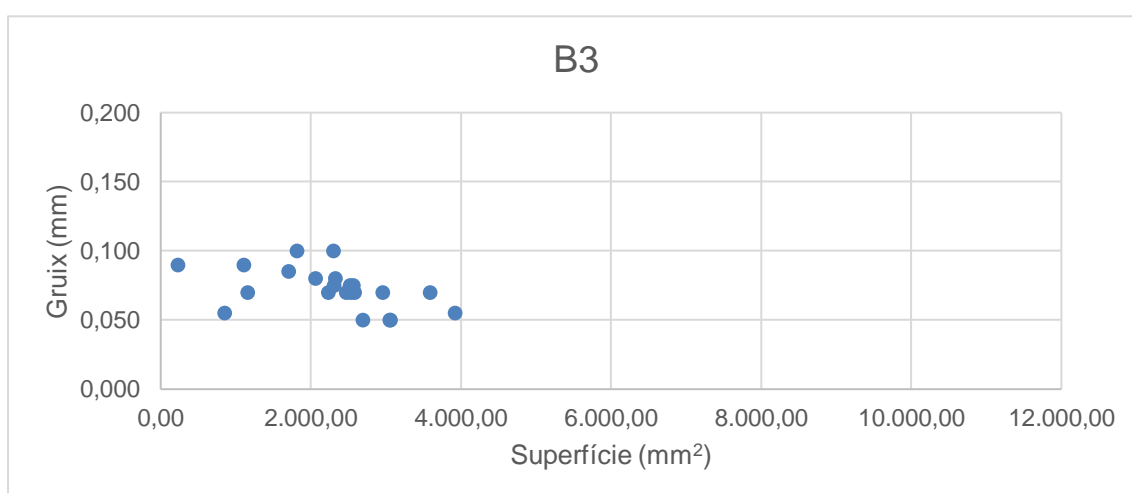


Figura 24: Superfície i gruix dels 22 fragments del B3, de diàmetre inicial 1.2 cm, en el 5è i últim mostreig.

Com podem observar, hi ha una relació inversa entre el gruix i la superfície, ja que, aquells fragments que en el 5è Mostreig presenten una major superfície, presenten uns gruixos menors.

Cal destacar aquells punts de les figures 22 i 23 amb poca superfície però amb valors de gruix molt elevats. Són 5 punts, dos al B1 i tres al B2 (encara que no es diferenciï, en el punt de gruix 0.140, en realitat són dos punts que se superposen). Són 5 fragments, que com s'ha dit, han presentat una aturada en el seu creixement però que com s'observa en aquestes gràfiques anteriors, presenten els majors gruixos.

D'aquesta forma, i per tal d'aclarir si l'augment en gruix ha compensat el no creixement de la superfície, s'ha estudiat la relació entre aquests dos paràmetres mitjançant la fórmula del volum següent:

$$\text{Volum (mm}^3\text{)} = \text{Superfície (mm}^2\text{)} \cdot \text{Gruix (mm)}$$

El resultat es pot observar en les figures 25, 26 i 27.

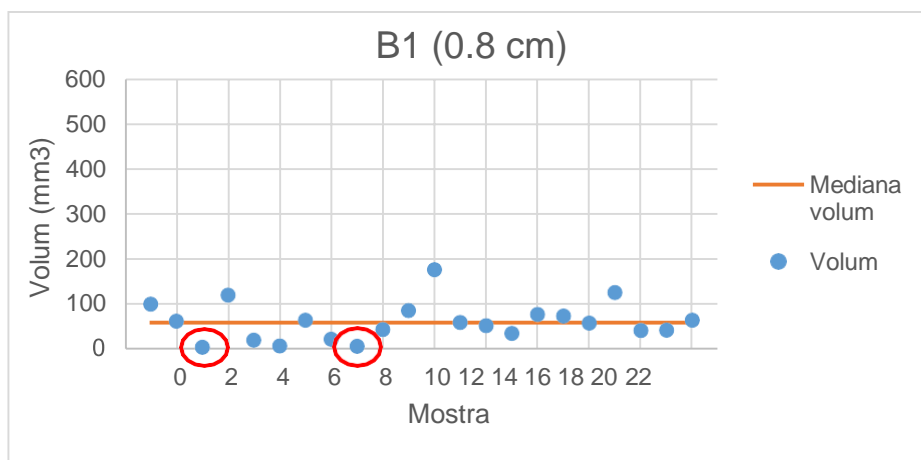


Figura 25: Volum dels 22 fragments del B1, de diàmetre 0.8 cm, en el 5è mostreig.

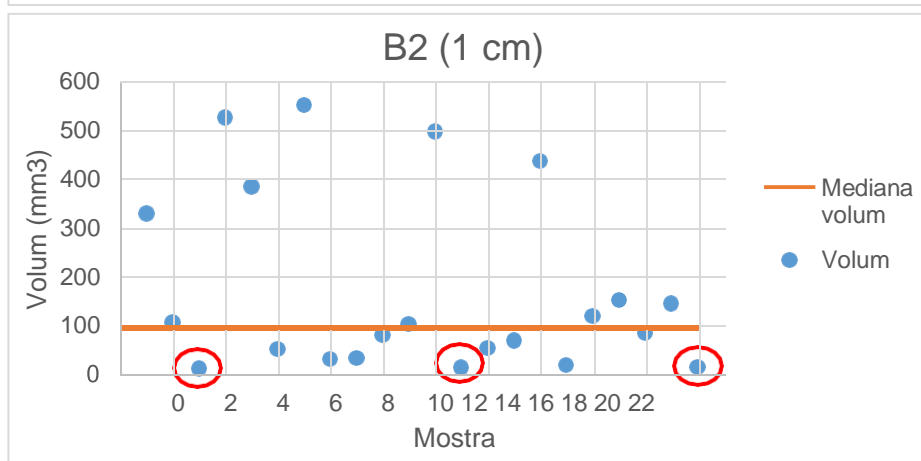


Figura 26: Volum dels 22 fragments del B2, de diàmetre 1 cm, en el 5è mostreig.

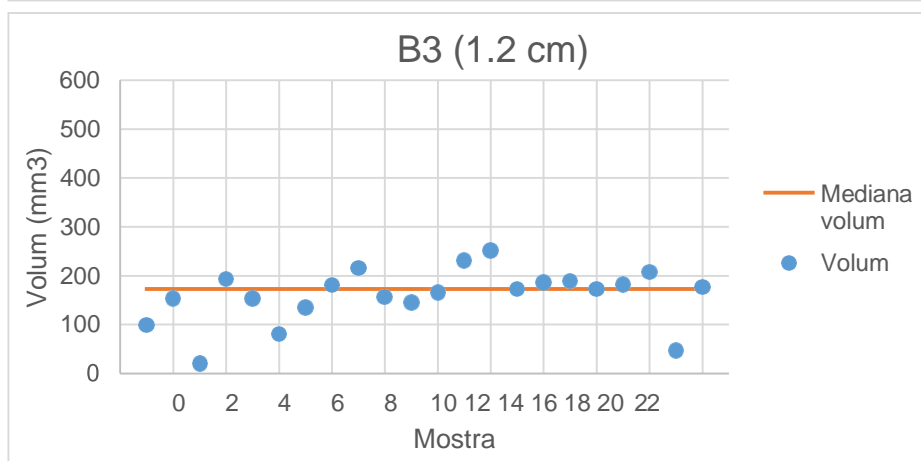


Figura 27: Volum dels 22 fragments del B3, de diàmetre 1.2 cm, en el 5è mostreig.

S'han remarcat els 5 punts dels quals s'ha parlat anteriorment. Com es pot observar, es podria dir que no hi ha hagut cap classe de compensació, és a dir, el seu augment en gruix no ha permès que el volum sigui semblant a la resta de fragments, ja que, tot i que en general, els 5 punts són molt propers a la mediana, aquests, representen els valors de volum més baixos, amb la qual cosa, es pot

deduir que l'augment en gruix no ha pogut compensar el no augment de la superfície.

### 3.2. EXPERIMENT 2: FRAGMENTS ZONA BASAL I APICAL

De la mateixa forma que en l'Experiment 1, s'ha realitzat l'estudi de l'evolució de la superfície dels dos tipus de fragments utilitzats.

Problemes observats: De la mateixa forma que en l'Experiment 1, es van produir certes obstruccions, sobretot a partir del 2n Mostreig. Per a solucionar-ho, a partir del 2n Mostreig, es va retirar les tapes/embuts dels tres bioreactors per a eliminar les rugositats que aquests tenien i així evitar més obstruccions. L'altre problema, que també s'ha esmentat anteriorment és el sistema de bombolleig, que en el B2 era de bombolla grossa, mentre que en el B3 era de bombolla petita.

Es van realitzar 6 mostreigs, els quals es troben fotografiats en les figures 28 i 29.

#### B2-Basals (Fragments zona basal. Diàmetre inicial= 0.8 cm)

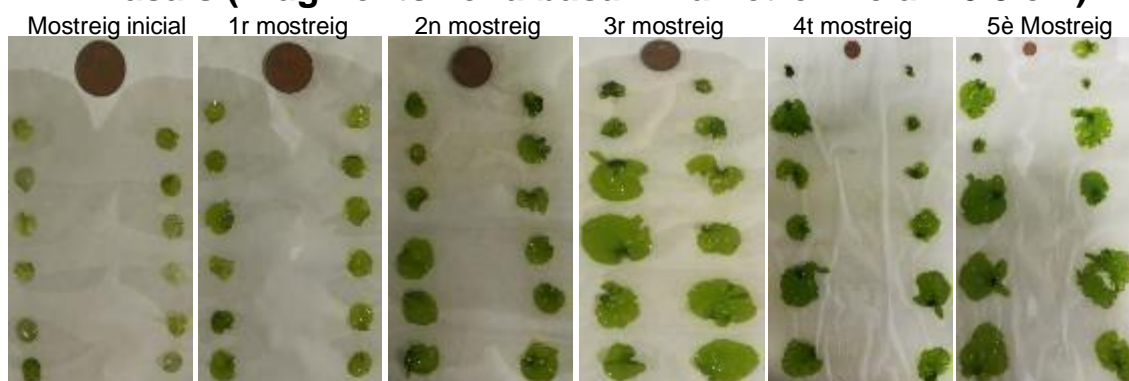


Figura 28: Mostreigs realitzats en el B2, fragments extrets de la zona basal de l'alga, zona propera a la radícula de la fulla als 0,4,7,11,14 i 17 dies des de l'inici de l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).

#### B3-Apicals (Fragments zona apical. Diàmetre inicial= 0.8 cm)

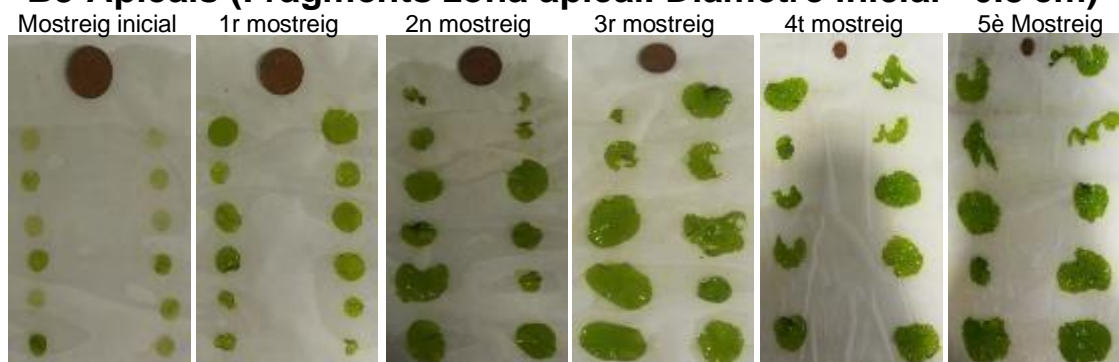


Figura 29: Mostreigs realitzats en el B3, fragments extrets de la zona apical de l'alga, zona propera al perímetre de la fulla als 0,4,7,11,14 i 17 dies des de l'inici de l'experiment (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC, 2019).

Com es pot observar, es van perdre dos fragments del B3 (Propers al perímetre/zona apical) entre el 2n i 3r Mostreig. Pèrdua que podria haver estat deguda a un estat inicial dels fragments poc favorable (poca consistència, gruix, edat, etc.) i degut a l'agitació aquests podrien haver estat desfets/triturats. En l'Annex C es troben detallades les taules de resultats de superfícies, gruixos i volums.

### SGR (Specific growth rate)

El mètode i fórmula utilitzats per al càlcul dels SGR és el mateix que s'ha utilitzat en l'experiment 1. Els SGR es presenten a la Taula 7.

*Taula 7: Taula dels SGR (o taxa de creixement) obtinguts en fragments basals i apicals en cada un dels mostreigs.*

|               | SGR (d <sup>-1</sup> )       |                         |                         |                          |                          |                          |
|---------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | Mostreig inicial<br>(0 dies) | 1r Mostreig<br>(4 dies) | 2n Mostreig<br>(7 dies) | 3r Mostreig<br>(11 dies) | 4t Mostreig<br>(14 dies) | 5è Mostreig<br>(17 dies) |
| <b>B2-Ba.</b> | 0                            | 0.109                   | 0.224                   | 0.251                    | 0.254                    | 0.268                    |
| <b>B3-Ap.</b> | 0                            | 0.169                   | 0.201                   | 0.175                    | 0.355                    | 0.146                    |

 Pèrdua de 2 fragments Apicals.

Com podem observar hi ha un augment progressiu de la taxa de creixement dels fragments de la zona basal, fet que no es dona en el cas de les mostres de la zona apical. Aquesta diferència podria ser produïda per la pèrdua de fragments apicals però si s'analitza bé, el SGR té en compte les superfícies globals i aquests fragments que s'han perdut eren fragments molt petits, la superfície dels quals no representava ni el 10% de la superfície total.

Una forma de corroborar això és treballant amb aquells fragments que representen el 90% de la biomassa total, ja que d'aquesta forma estarem excloent els fragments més petits (Taula 8):

*Taula 8: Taula dels SGR obtinguts en cada un dels mostreigs considerant només el 90% de la biomassa total dels fragments apicals i basals.*

|               | SGR (d <sup>-1</sup> )       |                         |                         |                          |                          |                          |
|---------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | Mostreig inicial<br>(0 dies) | 1r Mostreig<br>(4 dies) | 2n Mostreig<br>(7 dies) | 3r Mostreig<br>(11 dies) | 4t Mostreig<br>(14 dies) | 5è Mostreig<br>(17 dies) |
| <b>B2-Ba.</b> | 0                            | 0.095                   | 0.225                   | 0.259                    | 0.260                    | 0.255                    |
| <b>B3-Ap.</b> | 0                            | 0.156                   | 0.203                   | 0.175                    | 0.365                    | 0.141                    |

En la figura 30 es troben representades les evolucions dels SGR i el creixement de la superfície en els dos bioreactors.

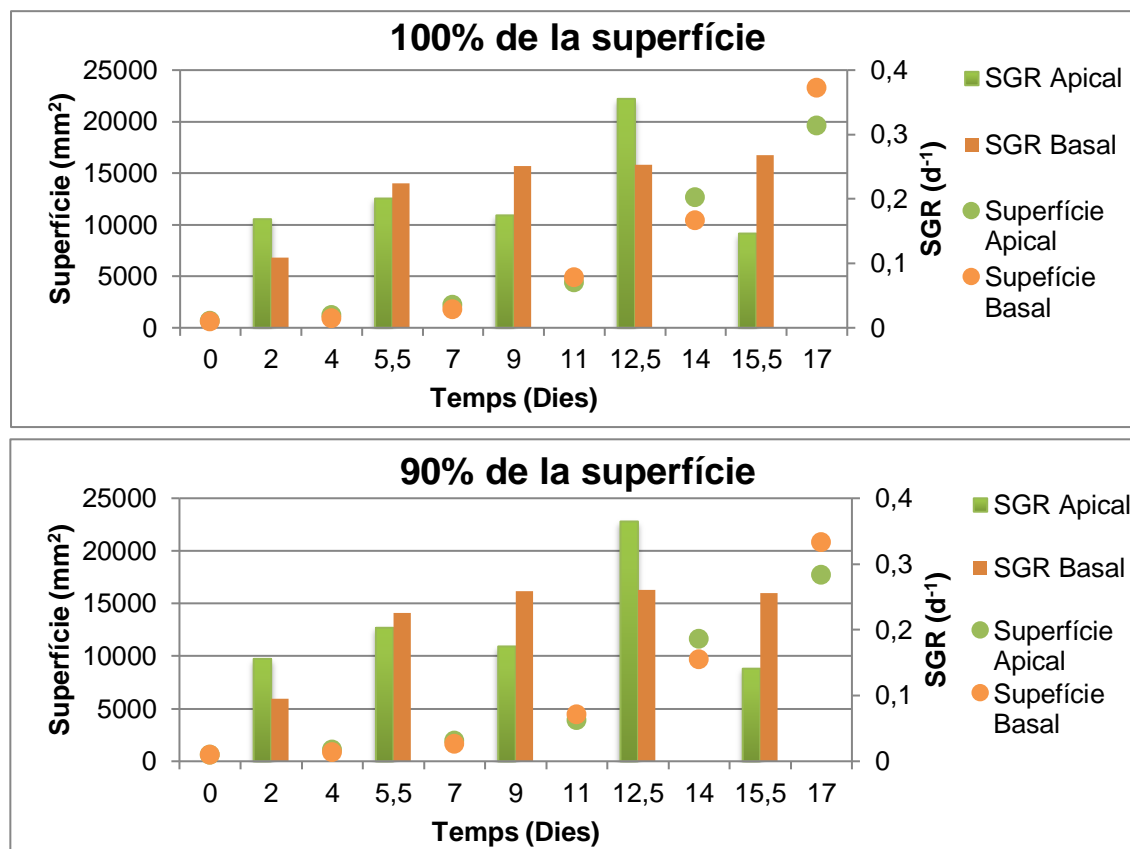


Figura 30: Evolució dels SGR (considerant el 100% i 90% de la superfície) amb la respectiva evolució de la superfície. Els mostreigs s'han dut a terme els dies 0,4,7,11,14 i 17.

Com es pot observar en la figura anterior no hi ha quasi diferències en l'evolució dels SGR, cosa que permet corroborar l'esmentat anteriorment. La diferència entre l'evolució del SGR dels fragments de la zona basal i els de la zona apical no ve donada per la pèrdua dels fragments apicals sinó per altres aspectes.

El més destacable de tot és la gran diferència en l'evolució dels SGR entre les mostres apicals i les basals. Com podem observar, en els primers dies les mostres properes a la radícula, les basals, presenten uns valors de SGR inferiors ( $0.095d^{-1}$ ) als de les mostres properes al perímetre, les apicals ( $0.156d^{-1}$ ). Les mostres basals però, van augmentant la seva taxa de creixement fins a un punt en el qual es manté estable, al voltant del  $0.260d^{-1}$ . Les mostres apicals per altra banda, tenen valors de SGR molt diversos, amb marcades oscil·lacions i un pic màxim de  $0.365d^{-1}$  en el 4t mostreig. Com que les mitjanes obtingudes són de  $0.221 \pm 0.065$  i  $0.209 \pm 0.084$  en basals i apicals respectivament, també es va realitzar ANOVA dels SGR i es va observar, igual que en el 1r experiment, que  $F_{valor} < \text{Valor crític per a } F$ , fet que no permet afirmar diferències significatives entre mitjanes.

## Superfície

Per tal d'estudiar la superfície s'utilitzarà el mateix procediment que amb l'experiment 1.

Primer s'analitzarà l'evolució "individual" (recordant que no és un estudi individualitzat, ja que no s'ha pogut fer el seguiment de mostres concretes). Les següents figures mostren la superfície de les diferents mostres en els diferents mostreigs:

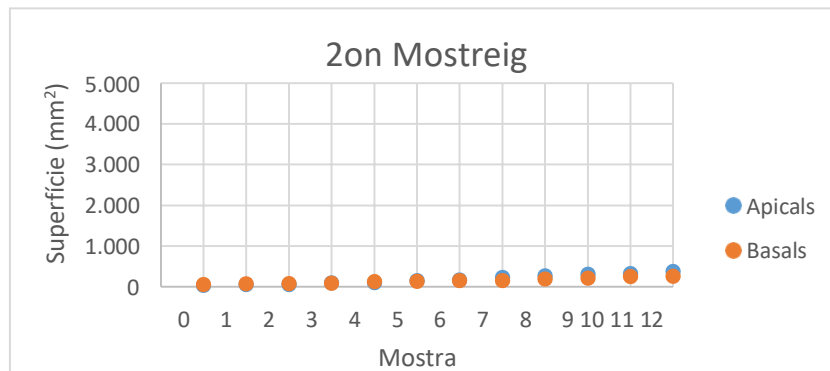


Figura 31: Representació gràfica de la superfície dels 12 fragments basals i apicals en el 2on mostreig.

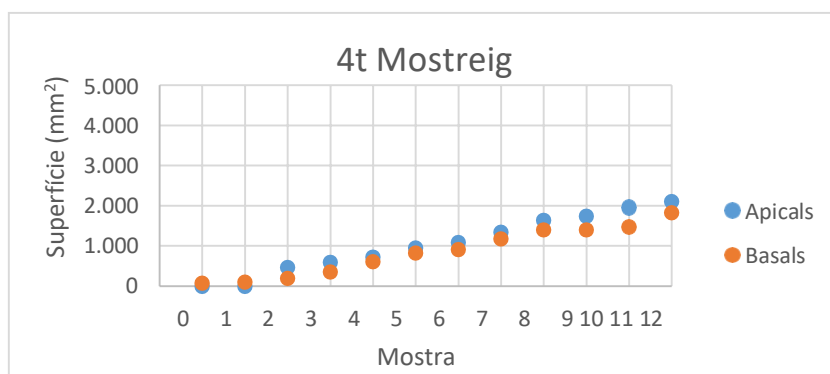


Figura 32: : Representació gràfica de la superfície dels 12 fragments basals i apicals en el 4t mostreig.

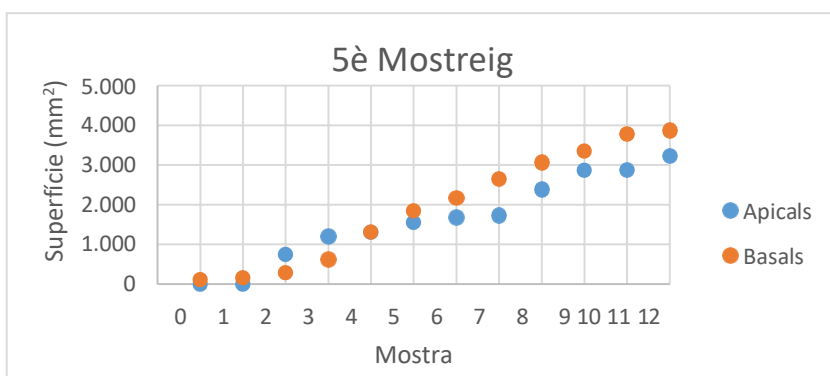


Figura 33: Representació gràfica de la superfície dels 12 fragments basals i apicals en el 5è i últim mostreig.

Es pot observar com a partir del 4t mostreig, bona part dels fragments propers al perímetre de la fulla (fragments apicals) començaven a distanciar-se en superfície dels fragments basals. No va ser fins a l'últim mostreig (el 5è Mostreig)



quan la majoria dels fragments basals van sobreposar-se a la majoria de fragments apicals. Aquest fet s'observa més bé si s'estudia aquells fragments que representen el 90% de la superfície, tal com es mostra en les figures 34 i 35.

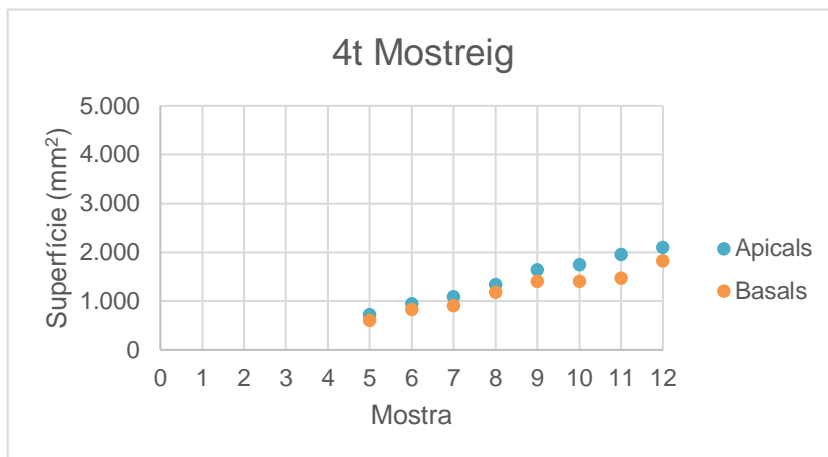


Figura 34: Representació gràfica dels fragments que representen el 90% de la superfície de basals i apicals en el 4t mostreig.

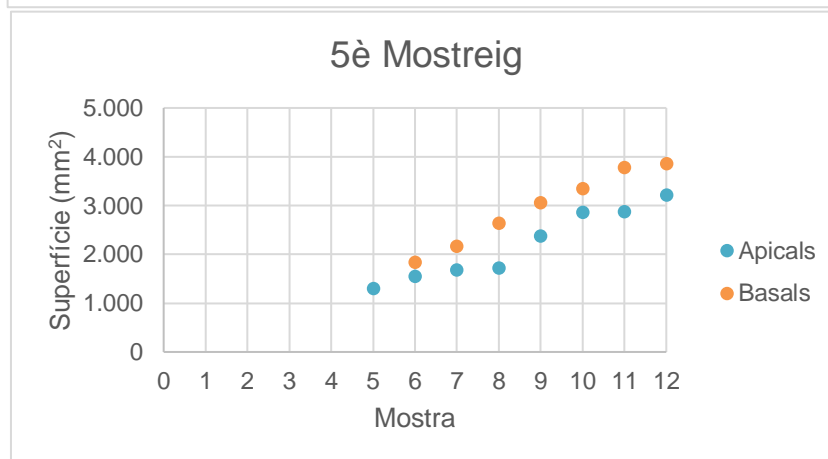


Figura 35: Representació gràfica dels fragments que representen el 90% de la superfície de basals i apicals en el 5è i últim mostreig.

Es pot veure un canvi sobtat del comportament dels fragments basals, ja que entre el 4t mostreig i el 5è mostreig (3 dies de diferència) els fragments basals més grans sobrepassen els fragments apicals. Un fet que es fonamenta amb la gran diferència en el SGR de l'últim mostreig (Taula 8).

Per tal d'estudiar com ha sigut la distribució de la superfície, s'ha d'estudiar el conjunt, i com s'ha fet en el primer experiment s'utilitzaran histogrames, tal com es representa en la figura 36.

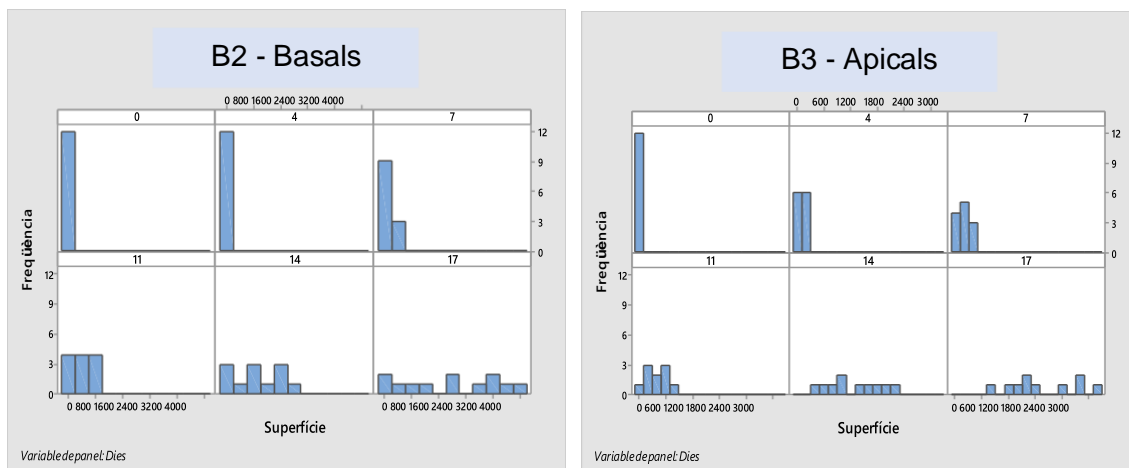


Figura 36: Histogrames de freqüència de les superfícies en els fragments basals i apicals en els diferents temps (dies) de mostreigs (0,4,7,11,14, i 17).

Com es pot veure en el creixement global no s'observa cap distribució normal, com a màxim podríem destacar els mostreigs dels fragments apicals realitzats als 7 i 11 dies d'iniciar l'experiment, on sí que s'observen distribucions Gaussians. El creixement ha evolucionat amb molt poca uniformitat entre fragments (Figura 36). L'únic contrast que es pot extreure és la diferència de superfície al final de l'experiment (Figura 30), una diferència que, molt probablement, podria venir deguda a la pèrdua de fragments apicals.

### Relació superfície-gruix

Com podem observar en les figures següents, en el cas dels fragments basals, aquells fragments de menor superfície són els que finalment han presentat els majors gruixos, un patró que sembla que els fragments apicals no han seguit en aquest cas.

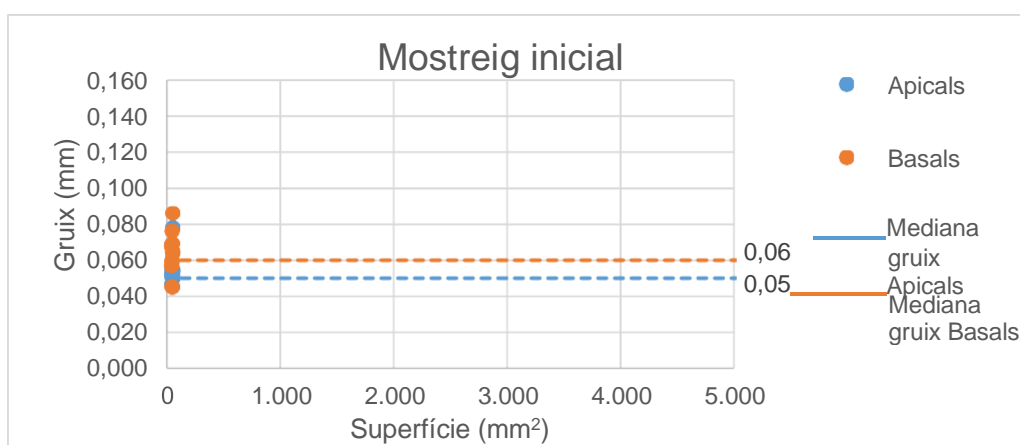


Figura 37: Superfície i gruix dels 12 fragments del B2 i B3 (basals i apicals), de diàmetre inicial.

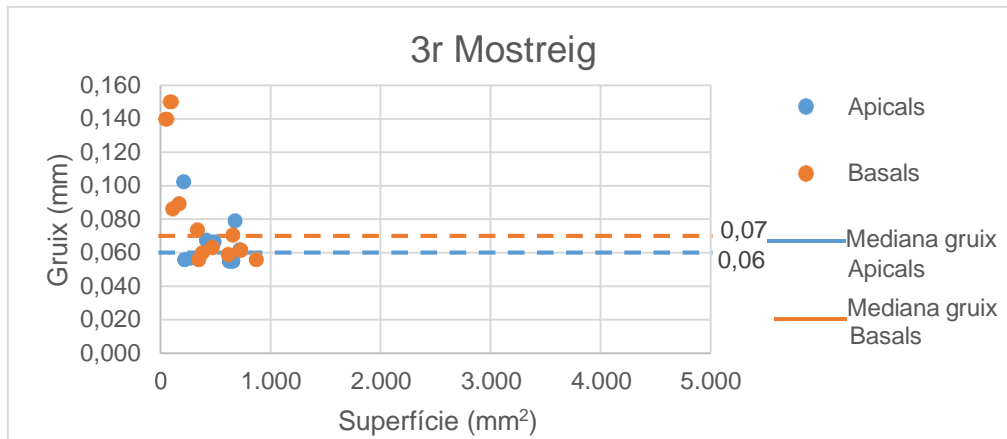


Figura 38: Superfície i gruix dels 12 fragments del B2 i B3 (Basals i apicals) de diàmetre inicial 0.8 en el 3r mostreig.

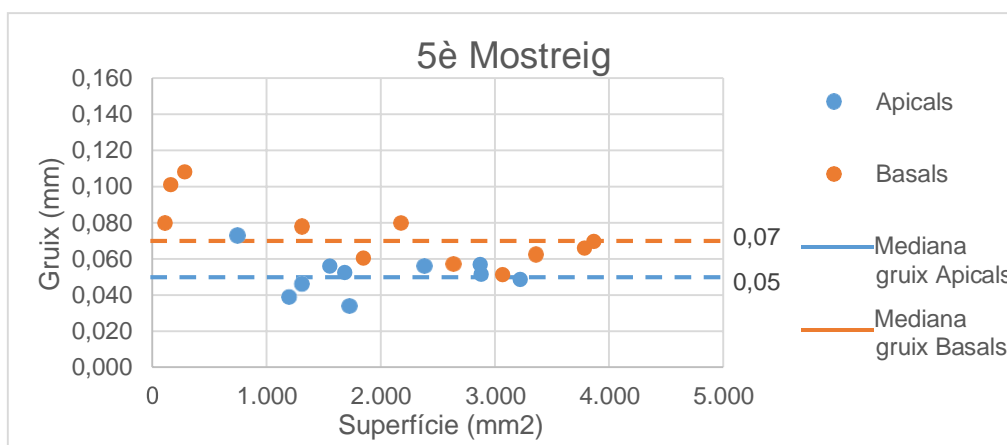


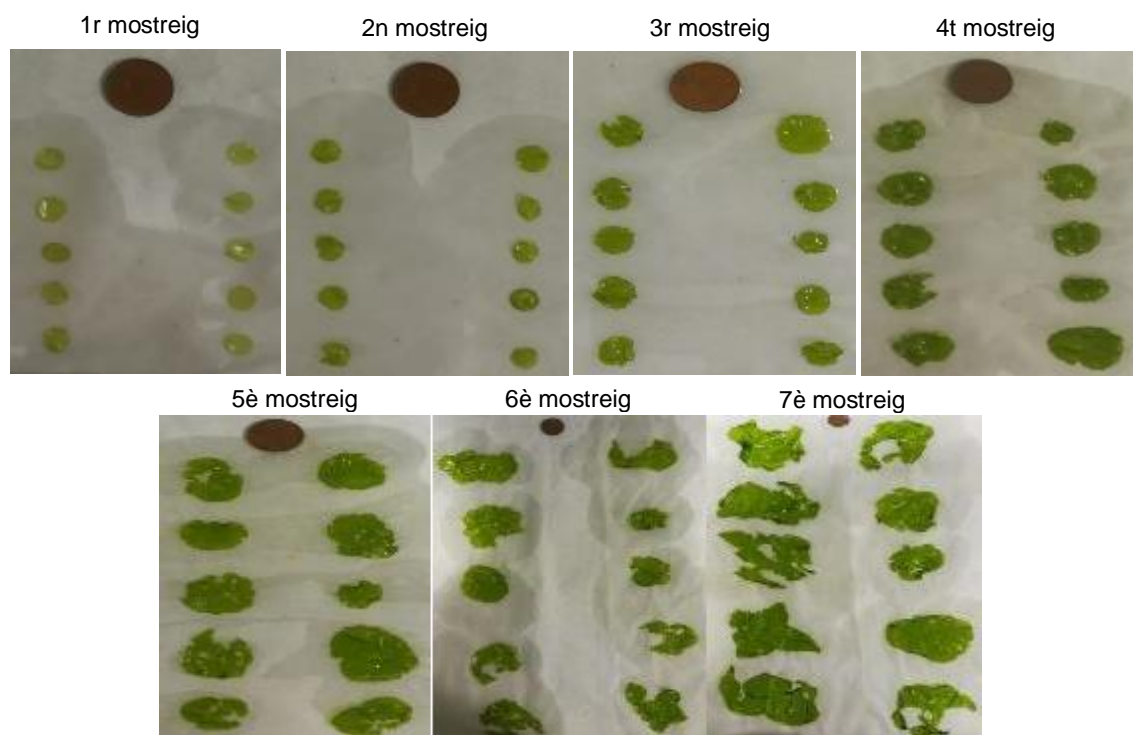
Figura 39: Superfície i gruix dels 12 fragments del B2 i B3 (basals i apicals), de diàmetre inicial 0.8 en el 5è mostreig.

En termes de gruix, els fragments basals han estat superiors, en general, als fragments apicals, ja que la mediana dels gruixos dels fragments propers a la radícula s'ha mantingut sempre per sobre la mediana dels fragments apicals. I és que com s'ha esmentat en l'apartat 1.1.3 la zona basal de l'*Ulva ohnoi* acostuma a presentar gruixos superiors a les zones apicals.

### 3.3. EXPERIMENT 3: REACTIVACIÓ DEL CREIXEMENT POST FASE DE CONSERVACIÓ

#### **Paquet 0**

Com ja s'ha esmentat en la part de materials i mètodes del paquet 0 (Apartat 3.3.3) es va dur a terme el mostreig inicial abans d'introduir el conjunt a la nevera (Figura 10), la Figura 40 són els diferents mostreigs realitzats durant l'etapa de creixement en bioreactors, és a dir, un cop passats els 8 dies a la nevera i 1 dia d'adaptació.



*Figura 40: Mostreigs realitzats del paquet 0 de fragments de diàmetre inicial= 0.8 cm als 0,3,6,10,13,17 i 21 dies des de l'inici de l'etapa de creixement en bioreactors (Fotografies realitzades per Josep Bringué Grau, ESAB, UPC. 2019).*

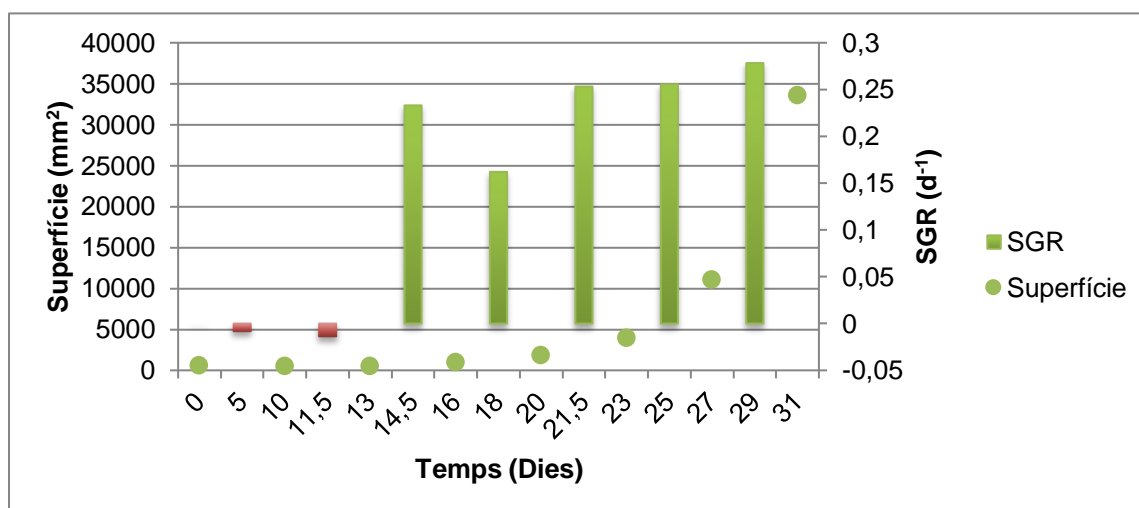
En l'Annex C es troben detallades les taules de resultats de superfícies, gruixos i volums.

Per al SGR, igual que la resta d'experiments, s'ha usat el mateix mètode i es calcula a partir de la superfície ( $\text{mm}^2$ ). La taula següent mostra l'evolució d'aquesta taxa de creixement o SGR des del mostreig inicial, realitzat abans d'introduir els fragments a la nevera (0 dies d'experiment) fins a l'últim mostreig (31 dies: 8 de nevera, 1 d'adaptació i 22 de creixement en bioreactors).

*Taula 9: Taula dels SGR obtinguts en cada un dels mostreigs realitzats en el Paquet 0. El mostreig inicial es va dur a terme abans d'introduir els fragments a la nevera. El 1r mostreig es va dur a terme al treure els fragments de la nevera. A partir del 1r mostreig, la resta són els mostreigs realitzats en l'etapa de cultiu als bioreactors.*

|    |     | SGR (d <sup>-1</sup> )       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                             |
|----|-----|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|    |     | Mostreig inicial<br>(0 dies) | 1r<br>Mostreig<br>(10 dies) | 2n<br>Mostreig<br>(13 dies) | 3r<br>Mostreig<br>(16 dies) | 4t<br>Mostreig<br>(20 dies) | 5è<br>Mostreig<br>(23 dies) | 6è<br>Mostreig<br>(27 dies) | 7è<br>Mostreig<br>(31 dies) |
| B1 | 0.8 | 0                            | -0.008                      | -0.014                      | 0.233                       | 0.162                       | 0.253                       | 0.256                       | 0.278                       |

El principal aspecte que ressalta en l'anterior taula és que es pot observar un decreixement inicial del SGR que, a partir dels 13 dies es transforma en un creixement força destacable que es va estabilitzant a partir del 16è dia (Figura 41).



*Figura 41: Evolució dels SGR amb la respectiva evolució de la superfície. Els mostreigs s'han dut a terme els dies 0, 10, 13, 16, 20, 23, 27 i 31.*

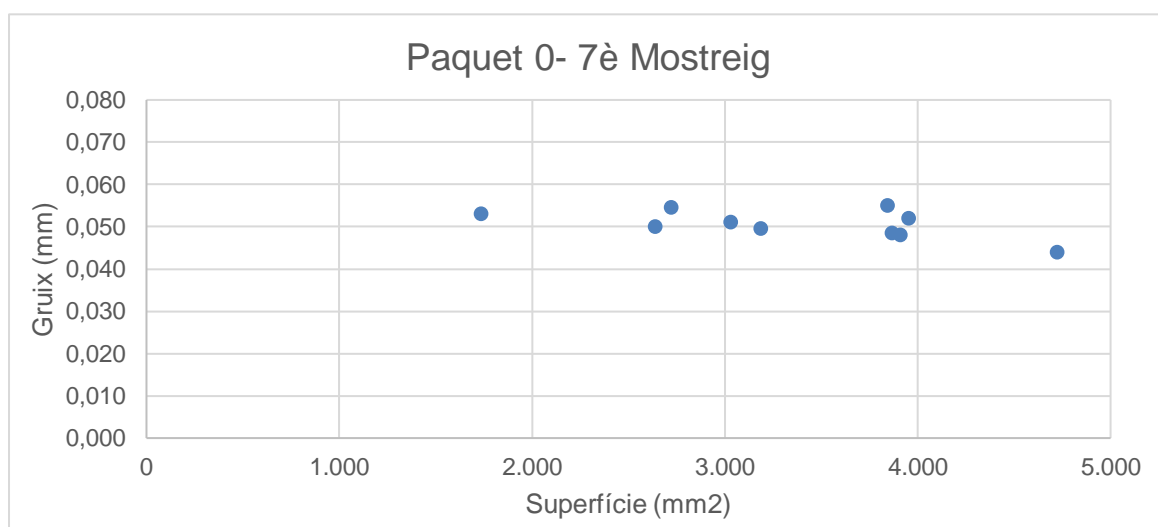
S'assoleix un SGR màxim de 0.278d<sup>-1</sup> als quasi 30 dies de cultiu. En l'article de G. Gao et al. (2017) s'estudien diferents mètodes de conservació de l'*Ulva rigida*, entre els quals es fa servir un cultiu d'*Ulva rigida* conservada a 4°C durant 1,2,7,30,92 i fins a 184 dies i "reactivada" a 18°C, 80 μmols·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> i un fotoperíode de 16L-8D durant 6 dies. Gao et al. (2017) va observar uns SGR de 0.206d<sup>-1</sup> ±0.58 amb 1 dia a la nevera, 0.231d<sup>-1</sup> ±0.58 amb 2 dies a la nevera, 0.253d<sup>-1</sup> ±0.51 i ±0.56 amb 7 i 30 dies a la nevera respectivament, i fins a un SGR de 0.206 d<sup>-1</sup> ±2.01 d<sup>-1</sup> amb 184 dies a la nevera (Gao et al., 2017). En comparació amb l'experiment que s'ha realitzat aquí, hi ha hagut un SGR negatiu al 6è dia, però per altra banda, s'ha assolit un SGR màxim de fins 0.278d<sup>-1</sup> al cap de 30 dies de cultiu i en augment.

Com es pot observar en la taula 10, l'experiment en el qual s'ha introduït una fase de conservació a baixes temperatures (Exp. 3) ha donat el SGR mig més alt. Aquest SGR mig del tercer experiment però, no té en compte els SGR negatius obtinguts en els dos primers mostreigs (Taula 9). És per això que en el 3r experiment es van realitzar dos mostreigs més que en el 1r i 2n experiments (ja que els dos primers mostreigs del 3r experiment no s'han tingut en compte per fer la mitja).

En aquest experiment també cal destacar la relació superfície-gruix que s'ha obtingut al final (Figura 42). Com es pot observar, no s'ha seguit la lògica que fins ara s'havia mantingut en els experiments anteriors, i és que, a diferència de la resta d'experiments, tots els fragments han obtingut gruixos semblants independentment de la seva superfície final. En la Figura 43 es pot veure com el creixement dels fragments ha sigut bastant uniforme entre ells, ja que com hem vist en anteriors experiments, es dona, més o menys, una distribució normal en els últims mostreigs.

*Taula 10: Resum dels SGR mig obtinguts en els tres experiments realitzats en aquest TFG.*

| Experiment | SGR (d <sup>-1</sup> )                      |                            |                               |
|------------|---|----------------------------|-------------------------------|
| 1          | <b>0.167 ±0.067</b> (0.8 cm)                | <b>0.192 ±0.048</b> (1 cm) | <b>0.167 ±0.064</b> (1.2 cm)  |
| 2          | <b>0.221 ±0.065</b> (Basals)                |                            | <b>0.209 ±0.084</b> (Apicals) |
| 3          | <b>0.236 ±0.045</b> (1 setmana a la nevera) |                            |                               |



*Figura 42: Superfície i gruix dels fragments del paquet 0, en el 7è Mostreig (31 dies des de l'inici de l'experiment).*

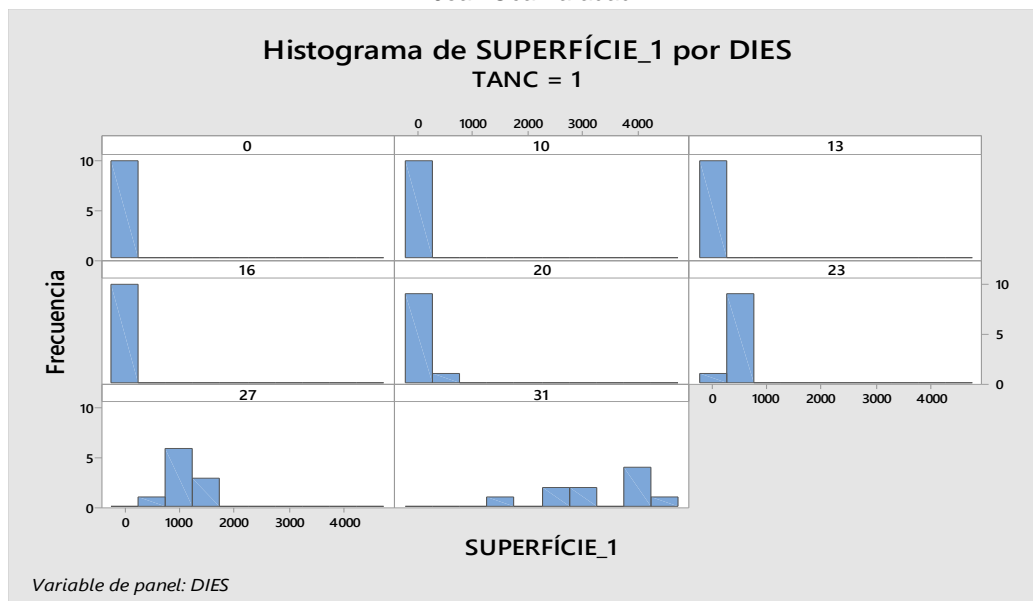


Figura 43: Histogrames de freqüència de les superfícies en els diferents temps (dies) de mostreigs (0, 10, 13, 16, 20, 23, 27 i 31).

### Altres conjunts de fragments

Malauradament, no es van obtenir resultats satisfactoris en cap de les altres combinacions/experiments. Tots els paquets de fragments, excepte el paquet 0 (els resultats del qual ja s'han resumit anteriorment) van morir al cap de 1-3 dies de cultiu als bioreactors.

La figura 44, mostra l'estat final d'un dels paquets on s'observa la pèrdua total de la pigmentació.

En la Taula 11 es mostren els dies de supervivència de cada un dels conjunts.

Degut a que en el laboratori en el qual s'ha treballat es disposa de ventiladors que permeten una renovació molt ràpida i gran de l'aire amb l'exterior, s'han utilitzat les temperatures de l'exterior del laboratori per estudiar possibles xocs tèrmics, ja que es consideren més o menys iguals a les de l'interior d'aquest (Taula 11).

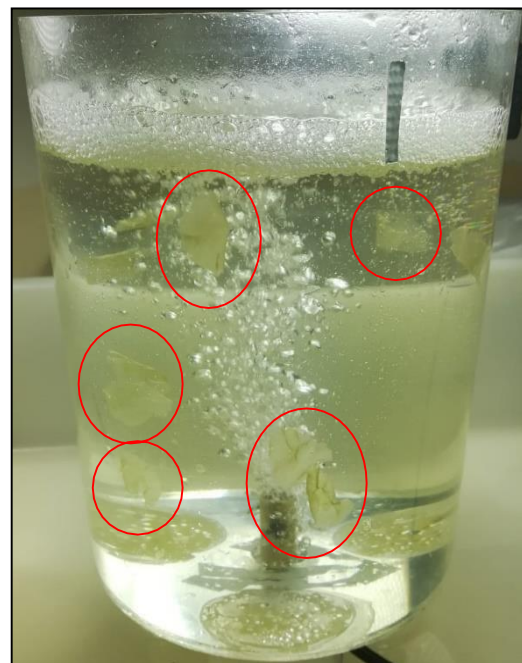


Figura 44: Fragments morts del paquet N5.

*Taula 11: Nombre de dies que van sobreviure cada conjunt de fragments amb les temperatures mínimes i màximes exteriors detectades en el dia en què es van treure els fragments de la nevera (Font: [www.freemeteo.es](http://www.freemeteo.es)).*

| <b>Nom</b> | <b>Supervivència en els bioreactors (Dies)</b> | <b>T<sub>Min</sub> (°C)</b> | <b>T<sub>Max</sub> (°C)</b> |
|------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>0</b>   | +20  | 12                          | 18                          |
| <b>1</b>   | 2  | 12                          | 21                          |
| <b>2</b>   | 3  | 15                          | 21                          |
| <b>3</b>   | 0  | 12                          | 18                          |
| <b>4</b>   | 2  | 12                          | 21                          |
| <b>J1</b>  | 3  | 23                          | 29                          |
| <b>J2</b>  | 3  | 22                          | 28                          |
| <b>N5</b>  | 1  | 22                          | 28                          |
| <b>N6</b>  | 3  | 23                          | 29                          |

Començant pel paquet 3, el procés de deixar el conjunt més d'un dia d'adaptació com es va fer en la resta (Apartat 2.3.3, Taula 4) va ser fatal, ja que els fragments es van morir al cap de 4 dies d'adaptació tot i que la temperatura exterior fos molt semblant a la del paquet 0 (Figura 45).

En els paquets J1 i J2, la fase pre-nevera no ha ajudat a la reactivació post període de conservació en nevera, ja que els fragments s'han mort 3 dies després d'iniciar la fase de creixement en bioreactors post-conservació en nevera.

En tots els paquets de fragments destaca la variació tèrmica que han patit durant l'etapa d'adaptació, on han patit un augment d'entre 11 i 18 °C en poques hores, un xoc tèrmic que podria haver influenciat en la seva mort.

Aquest salt tèrmic segurament està molt relacionat amb la temperatura ambiental durant el període d'adaptació. La Taula 11 mostra les màximes i mínimes temperatures dels dies en què es va treure de la nevera cada conjunt de fragments. Amb aquesta taula es pot observar com els J1, J2, N5 i N6 s'han tret de la nevera en dies d'elevades temperatures, això podria haver produït un xoc tèrmic important sobre les algues (Ja que aquestes sortien de la nevera a 7-8°C).



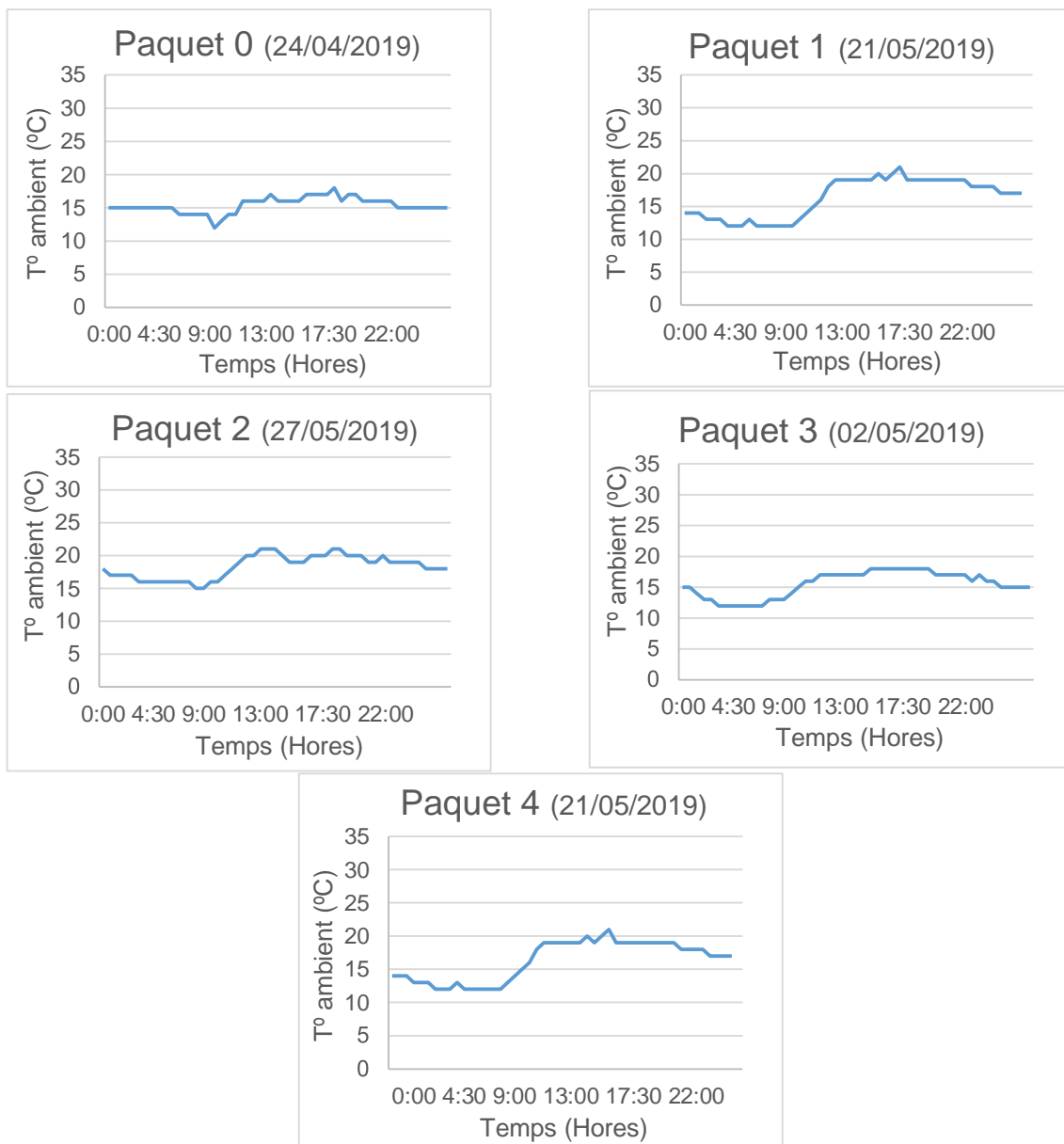


Figura 45: Evolució de la temperatura ambient el dia en què es retiraven els fragments de la nevera (Font: [www.freemeteo.es](http://www.freemeteo.es)).

Els conjunts 1, 2, i 4 es van treure en dies on la temperatura ambient era molt semblant a la del dia en què es va treure de la nevera el conjunt 0, en la figura anterior es mostra l'evolució de la temperatura ambient el dia en què es retiraven els fragments de la nevera.

La retirada de la nevera es produïa entre les 9:00 i la 13:00 i com es pot observar el dia en què es va retirar el paquet 0 la temperatura ambient va ser molt més estable que en la resta, fet que podria haver influenciat, ja que només el paquet 0 va sobreviure.

Potser caldria intentar un procés d'adaptació que, de forma gradual i controlada augmentés la temperatura dels conjunts sense produir canvis de més de 10 °C en poques hores. Es va intentar mitjançant una galleda amb 15-25L d'aigua entre 5-8°C en la qual se situava el conjunt de fragments per a intentar que amb un major volum d'aigua, la temperatura no es disparés tant, però tampoc va funcionar, es necessitaria un mètode més eficaç.

G. Gao et al. (2017) com ja s'ha comentat abans va conservar les algues a 4 °C durant 30 dies (Com el paquet 3) i sis dies després de creixement en bioreactors va obtenir un SGR de  $0.253\text{d}^{-1} \pm 0.56$ , en canvi en aquest treball, s'ha conservat les algues a 7-8 °C i amb un fotoperíode durant la fase en bioreactors de 12L:12D

a  $60-70 \frac{\mu\text{mols fotons}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ . G. Gao et al. (2017) subministrava 150 µM de nitrats i 7.5 µM de fosfats en cada renovació d'aigua que feia cada 2 dies (Gao et al., 2017). Aquest control dels nutrients que entren no s'ha controlat del tot en aquest experiment, es sap que una vegada finalitzat l'experiment els nitrats del sistema d'on s'aconseguia l'aigua per a les renovacions contenia  $\pm 160 \mu\text{M}$  de nitrat però un valor desconegut de fosfats. Potser també hauria estat necessari un control dels nutrients d'entrada.

## 4. CONCLUSIONS

### **Experiment 1: Fragments circulars de diferent diàmetre.**

Els resultats obtinguts apunten a què a nivell industrial una bona estratègia seria iniciar el cultiu de l'alga a partir de fragments d'1 o 1.2 cm de diàmetre inicial i posteriorment passar-los a tancs de cultius més grans, donat que aquests fragments tenen un creixement molt ràpid i això permetria una millor planificació de la producció. També s'ha vist però, que estadísticament les mitjanes no presenten diferències significatives, cosa que fa pensar que, tot i els resultats obtinguts, seria necessari realitzar més rèpliques per a poder obtenir mitjanes més representatives.

### **Experiment 2: Fragments zona basal i apical.**

El més destacable és la diferència entre l'evolució dels fragments basals i els apicals. Els primers van seguir una evolució força estable amb un augment progressiu del SGR mentre que els segons van seguir una evolució molt més

alterada, amb oscil·lacions marcades en la taxa de creixement. També s'ha observat un creixement retardat dels fragments propers a la radícula (basals), i és que aquests van tardar fins a un mostreig més que els fragments apicals en començar a créixer. Tot i això, a partir del moment en què els fragments basals "s'activen" (entenen activar-se com a començar un creixement representatiu), aquests comencen a augmentar la taxa de creixement de forma quasi lineal. De la mateixa forma que en l'experiment 1, no es poden afirmar diferències significatives entre apical i basal, per això, farien falta més repliques per tal de poder parlar de dades representatives.

### **Experiment 3: Reactivació del creixement post fase de conservació.**

El paquet 0 ha donat algunes pistes de com podria ser l'evolució del creixement. El més destacable ha estat l'SGR negatiu dels primers dies al bioreactor, i la posterior recuperació d'aquests fragments i reactivació del creixement tot i la taxa negativa dels primers dies. La mort de la resta de conjunt de mostres han fet veure quins podrien ser els problemes més importants, o bé la fase d'adaptació, o bé la quantitat de dies que es conserven els fragments a la nevera.

Seria necessari realitzar un estudi més complet sobre la fase de conservació a la nevera i la posterior etapa d'adaptació, ja que són dos processos força complexos com per a tractar-los en un sol apartat com s'ha fet en aquest treball. Seria força interessant estudiar-ho, ja que seria una tècnica de conservació d'algues que permetria, de forma controlada i definida, activar el creixement de les algues en el moment en què al productor li interessés per tal de programar la sortida del producte de la instal·lació. D'aquesta forma, no seria necessari mantenir grans quantitats d'algues en creixement mentre no siguin necessàries, només seria necessari mantenir petits fragments a la nevera, això podria reduir costos, ja que no seria necessari tenir els sistemes de llum i agitació durant tot l'any, no es llençaria producte, etc.

## **5. PERSPECTIVA PER FUTURS TREBALLS**

### **Els inhibidors de creixement**

Certs autors com Vesty et al. (2015) parlen de substàncies inhibidores dels processos de formació de gàmetes i espores, i per tant, considerades inhibidores del creixement de l'Ulva. Vesty et al. (2015) va treballar sobre *U. mutabilis*, i parla de tres tipus d'inhibidors: SI-1 (glicoproteïna), SI-2 (estructura no proteica de baix pes molecular) i "the swarming inhibitor" (inhibidor que evita l'alliberació dels gàmetes un cop han sigut induïts a la seva formació) (Vesty et al., 2015).

Stratmann et al. (1996) va observar que tant el SI-1 com el SI-2 són inhibidors de l'esperulació i que, mentre el primer és un component de la paret cel·lular, el segon es produeix en l'espai que hi ha entre les dues capes de cèl·lules (Stratman et al., 1996).

Per altra banda, "The swarming inhibitor" o SWI va ser descrit per Wichard i Oertel (2010). Wichard i Oertel van estudiar l'efecte de la concentració d'aquest inhibidor. Afirmen que una concentració del SWI per sobre de la concentració inhibidora produeix que els gàmetes ja madurs es quedin immòbils dins la gametàngia i per tant no es produïa creixement (Wichard i Oertel, 2010).

Stratmann et al. (1996), va treballar sobre *U. mutabilis* i va obtenir taxes de creixement molt més baixes en els fragments basals en comparació els fragments apicals. Stratmann et al. (1996) al·lega que les cèl·lules responsables de la producció d'inhibidors de l'esperulació són les cèl·lules basals.

Hiraoka (1998) introdueix una hipòtesi que podria explicar aquest comportament de la zona basal, la hipòtesi formulada és la següent: "Els fragments amb doble capa cel·lular tendeixen a esporular més tard que els fragments d'una sola capa de cèl·lules". A més a més, afegeix que els fragments de doble capa podrien ser responsables de mantenir una concentració elevada dels anomenats inhibidors de creixement, fet que produiria un retard en l'esperulació fins que no es produïssin les primeres monocapes en el fragment, a partir del qual l'esperulació seria el "normal" (Hiraoka i Enomoto, 1998).

Aquesta hipòtesi no podria ser aplicada en l'*Ulva ohnoi*, ja que està formada per una doble capa en tota la superfície de la fulla.

En aquest cas, tal com estan descrits per aquests autors, aquests inhibidors no afecten el creixement vegetatiu de l'alga, només al procés d'esperulació i formació de gàmetes, però és una base per a confirmar que els fragments basals i apicals es comporten de forma diferent en termes d'esperulació i formació de gàmetes. De la mateixa forma, que el comportament dels dos tipus de fragments és diferent en aquest aspecte, podria ser que també tinguessin diferències en el creixement vegetatiu. En un futur projecte em semblaria molt interessant intentar treballar amb aquest concepte dels inhibidors, estudiar si tenen algun tipus de relació amb el creixement vegetatiu (no només en els processos d'esperulació i formació de gàmetes) i identificar aquests inhibidors en l'espècie tractada en aquest TFG, l'*Ulva ohnoi*.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez Cobelas, M., & Gallardo García, T. (1989).** *Una revisión sobre la biotecnología de las algas. Botanica Complutensis*, (15), 9–60. <https://doi.org/10.5209/BOCM.7403>
- Axelsson, L., Larsson, C., & Ryberg, H. (1999).** *Affinity, capacity and oxygen sensitivity of two different mechanisms for bicarbonate utilization in Ulva lactuca L. (Chlorophyta). Plant, Cell and Environment*, 22(8), 969–978. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00470.x>
- Carballo, R. Q. (2012).** *Acuicultura multitrófica integrada, una alternativa sostenible y de futuro para los cultivos marinos de Galicia.* <https://doi.org/c693-2012>
- Casais E. (2016).** *Desarrollo de cultivos de Ulva (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI) (Vol. 52).*
- Coste, O. (2018).** *Estudio del alga verde ulva para su uso en alimentación funcional en acuicultura: desarrollo de procesos biotecnológicos para determinar la bioactividad del polisacárido sulfatado ulvan.* Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=150030>
- Coutinho, R., & Zingmark, R. (1993).** *Interactions of light and nitrogen on photosynthesis and growth of the marine macroalga Ulva curvata (Kützinger) De Toni. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 167(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90180-V](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90180-V)
- Curra Feijóo, N. (2017).** *Ulva ohnoi (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas AMTI-RAS: Influencia en su desarrollo de las concentraciones de nitrógeno y fósforo del medio de cultivo.*
- DFO. (1996).** *Aquaculture IMTA*. 144(4), 389. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)84979-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(96)84979-9)
- Escribano, A. (2019).** *Influencia del sistema de cultivo en la morfología y productividad de Ulva Ohnoi: Fotobiorreactores, cultivos de fragmentos de talo en tanques y cuerdas de cultivo. Trabajo final de Grado Universidad Politecnica de Catalunya (UPC), Enero 2019.*
- Ferdouse, F., Holdt, S. L., Smith, R., Murúa, P., & Yang, Z. (2018).** *The global status of seaweed production, trade and utilization. In FAO Globefish Research Programme (Vol. 124).*
- Gaitero, A. (2012).** *Diseño de un Prototipo de Fotobiorreactor para el Cultivo de " Spirulina Platensis ". Conama, 25.*
- Gao, G., Clare, A. S., Rose, C., & Caldwell, G. S. (2017).** *Non-cryogenic preservation of thalli, germlings, and gametes of the green seaweed Ulva rigida. Aquaculture*, 473(June 2014), 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.012>
- Geertz-Hansen, O., Sand-Jensen, K., Hansen, D. F., & Christiansen, A. (1993).** *Growth and grazing control of abundance of the marine macroalga, Ulva lactuca L. in a eutrophic Danish estuary. Aquatic Botany*, 46(2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(93\)90039-Y](https://doi.org/10.1016/0304-3770(93)90039-Y)
- Goldman, J. C., Dennett, M. R., & Riley, C. B. (1981).** *Inorganic carbon sources and biomass regulation in intensive microalgal cultures. Biotechnology and Bioengineering*, 23(5), 995–1014. <https://doi.org/10.1002/bit.260230508>
- Hiraoka, M., & Enomoto, S. (1998).** *The induction of reproductive cell formation of Ulva pertusa Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). Phycological Research*, 46(3), 199–203. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1998.tb00114.x>

- Hiraoka, M., Shimada, S., Uenosono, M., & Masuda, M. (2004).** *A new green-tide-forming alga, Ulva ohnoi Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. Phycological Research, 52(1), 17–29.* <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2004.tb00311.x>
- Neori, A., & Gordin, H. (1991).** *Ulva lactuca Biofilters for Marine Fishpond Effluents II. Growth Rate, Yield and C:N Ratio. Botanica Marina, 34(6), 483–490.* <https://doi.org/10.1515/botm.1991.34.6.483>
- Quitral R., V., Morales G., C., Sepúlveda L., M., & Schwartz M., M. (2012).** *Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. Revista Chilena de Nutricion, 39(4), 196–202.* <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>
- Stratman et al. (1996).** *Differentiation of ulva mutabilis (chlorophyta) gametangia and Gamete release are controlled by extracellular inhibitors. University of Regensburg, December 1995.*
- Vesty, E. F., Kessler, R. W., Wichard, T., & Coates, J. C. (2015).** *Regulation of gametogenesis and zoosporogenesis in Ulva linza (Chlorophyta): comparison with Ulva mutabilis and potential for laboratory culture. Frontiers in Plant Science, 6(January), 1–8.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00015>
- Wichard, T., & Oertel, W. (2010).** *Gametogenesis and gamete release of Ulva Mutabilis and Ulva Lactuca (Chlorophyta): Regulatory effects and chemical characterization of the “swarming inhibitor.” Journal of Phycology, 46(2), 248–259.* <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00816.x>

## PAGINES WEB CONSULTADES

- Jose Maria Fernandez, Sevilla, 2014 , <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-3-nutrientes.html>, consultat el 27-04-2019.
- Ipac. , 01-03-2017, [http://www.ipacuicultura.com/noticias/en\\_portada/54165/francia\\_e\\_irlanda\\_despuntan\\_en\\_la\\_ue\\_en\\_produccion\\_de\\_algas\\_marinas\\_.html](http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/54165/francia_e_irlanda_despuntan_en_la_ue_en_produccion_de_algas_marinas_.html) , consultat el 07/04/2019.
- “Freemeteo”, <https://freemeteo.es/eltiempo/castelldefels/historial/historial-diario/?gid=3125897istation=2867idate=2019-07-04ilanguage=spanishicountry=spain>, consultat el 02/09/2019.